

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e chirurgia

CD38 come possibile target terapeutico nelle malattie autoimmuni: uno studio preliminare nella sclerosi sistemica

Relatore: Chiar.mo

Prof. Armando Gabrielli

Tesi di Laurea di:

Matteo Pepa

A.A. 2019/2020

INDICE

1. INTRODUZIONE…….…….5

1.1 SCLEROSI SISTEMICA……..……5

1.1.1 Aspetti generali……..……5

1.2 PATOGENESI……6

1.2.1 Alterazioni vascolari…….…..7

1.2.2 Risposta infiammatoria ed immunitaria……..….8

1.2.3 Fibrosi……..9

1.3 ASPETTI CLINICI……....10

1.3.1 Fenomeno di Raynaud……..…10

1.3.2 Manifestazioni cutanee……11

1.3.3 Manifestazioni muscolo-scheletriche……..……13

1.3.4 Manifestazioni gastro-enteriche…….……..14

1.3.5 Manifestazioni cardiache……15

1.3.6 Manifestazioni renali……..…..16

1.3.7 Manifestazioni polmonari……..…….16

1.4 DIAGNOSI……17

1.5 PROGNOSI……..…….20

1.6 ASPETTI TERAPEUTICI……..…..21

1.6.1 Terapia delle complicanze vascolari……..…21

1.6.2 Terapia delle complicanze gastrointestinali……..21

1.6.3 Terapia delle complicanze renali……22

1.6.4 Terapia delle complicanze polmonari……22

1.6.5 Terapia immunosoppressiva……23

2. CD38: UN POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO……..……..26

2.1 L'ASSE CD38/CD39/CD73/CD203a ED IL SUO RUOLO NELL'OMEOSTASI DEL SISTEMA IMMUNITARIO……..…….26

2.2 IL CD38 DALLA RICERCA CLINICA: FOCUS SUL MIELOMA MULTIPLO…..…..29

2.3 IL RUOLO DEL CD38 NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI…….....34

2.4 CD38: UN POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO NELLA SCLEROSI SISTEMICA?.....38

3. SCOPO DELLA TESI……..……..42

4. MATERIALI E METODI…….……44

4.1 PAZIENTI……..……44

4.2 RACCOLTA CAMPIONI E CITOFLUORIMETRIA…….44

4.3 ANALISI STATISTICA……..…….45

5. RISULTATI…….…….46

5.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI……..…….46

5.2 ANALISI DELLE POPOLAZIONI LINFOCITARIE……..47

6. DISCUSSIONE…….……..52

7. CONCLUSIONI……..……..….54

8. BIBLIOGRAFIA……..55

1. INTRODUZIONE

1.1 SCLEROSI SISTEMICA

1.1.1 Aspetti generali

La sclerosi sistemica, detta anche sclerodermia, è una patologia reumatologica di natura immuno-mediata che è caratterizzata dalla presenza di fibrosi cutanea e degli organi interni e da vasculopatia. (1)
La sclerosi sistemica ha una prevalenza che va dai 7 ai 489 casi su milione, ed un'incidenza variabile da 0.6 a 122 casi su milione. A supporto di questo range così ampio c'è una forte variabilità geografica per quel che riguarda la distribuzione di malattia: per esempio la SSc ha una prevalenza maggiore negli USA ed in Australia rispetto a quella del Giappone o dell'Europa, inoltre si osserva anche un certo gradiente Nord-Sud in nazioni come Francia ed Inghilterra. Inoltre ci sono altri fattori di rischio non modificabili che predispongono maggiormente alla patologia: ad esempio il sesso femminile è più interessato dalla SSc, soprattutto nel periodo pre-menopausale con un'incidenza di 3.4:1 rispetto al sesso maschile (contro un'incidenza del 2.4:1 nel periodo post-menopausale), oppure la razza nera è più predisposta all'insorgenza della malattia ed a una sua evoluzione più aggressiva. L'esordio della malattia, anch'esso influenzato da sesso ed etnia, è tipico dell'adulto, con picco di insorgenza attorno alla quinta decade di vita, mentre è raro nell'infanzia. (2)
Nell'ambito diagnostico l'ACR (American College of Rheumatology) e EULAR (European League Against Rheumatism) hanno proposto nel 2013 dei criteri aggiornati per la classificazione della SSc volti a permettere la diagnosi più precoce o la diagnosi di forme di SSc più lievi. Nello specifico questi criteri sono: ispessimento cutaneo, ulcere digitali, teleangectasia, anomalie del pattern capillaroscopico, coinvolgimento polmonare, fenomeno di Raynaud, presenza di auto-anticorpi correlati alla SSc, ipertensione polmonare e/o fibrosi polmonare. (3) (4)
La SSc è divisa in due varianti cliniche: la forma limitata e la forma diffusa, la seconda delle quali comporta chiaramente una sopravvivenza più ridotta. Le due forme si distinguono principalmente in base alla fibrosi cutanea ed al coinvolgimento viscerale: nella forma limitata la sclerosi cutanea si localizza a livello di mani, viso e collo, inoltre ci sono manifestazioni vascolari prominenti e sindrome CREST (calcinosi cutanea, fenomeno di Raynaud, disfagia, sclerodattilia e teleangectasia); nella forma diffusa il coinvolgimento cutaneo è esteso anche a tronco ed arti inferiori, e si ha un maggior

interessamento di reni, cuore e polmoni. (5)
Esiste tuttavia anche una terza variante clinica molto rara che è la SSc sine sclerodermia, caratterizzata dalla totale o parziale assenza delle manifestazioni cutanee della SSc, mentre resta invariato il coinvolgimento degli organi interno e le alterazioni sierologiche. La ssSSc si può manifestare in tre forme: nel tipo I (completa) si ha coinvolgimento degli organi interni e fenomeno di Raynaud in assenza di coinvolgimento cutaneo; nel tipo II (incompleta) si ha assenza di sclerodattilia ma si hanno altre manifestazioni cutanee (come le ulcere digitali, le calcificazioni e le teleangectasie) ed il coinvolgimento degli organi interni; nel tipo III (ritardata) si ha che il coinvolgimento cutaneo, che può essere completo od incompleto, si manifesta solo successivamente all'interessamento degli organi viscerali. (6)
Ci sono alcuni pazienti affetti da SSc che presentano la così detta sindrome da overlap: ovvero alla SSc si sovrappone un'ulteriore patologie del connettivo come l'artrite reumatoide o la polimiosite. (7)

1.2 PATOGENESI

La SSc è caratterizzata da fibrosi estesa, alterazioni vascolari ed anticorpi diretti contro gli antigeni cellulari. Da studi epidemiologici si è visto che nei parenti di primo grado di pazienti sclerodermici il rischio di sviluppare la patologia è del 1,6%, contro lo 0,026% della popolazione generale. Questo fatto associato all'elevata frequenza di altri disordini autoimmuni concomitanti e alle differenze fenotipiche legate alla ragazza suggeriscono il fatto che nella patogenesi della SSc ci sia una forte componente genetica. Come molti disordini autoimmuni vi è una forte correlazione tra alcuni polimorfismi HLA, fenotipi clinici e specifici anticorpi: ad esempio HLA DQB1-0501 è associato agli anticorpi anticentromero. È verosimile che alla base dell'induzione della SSc ci sia un'interazione tra suscettibilità individuale e fattori ambientali: l'esposizione alla silice cristallina o ad altri solventi sembra essere associata a un rischio aumentato; si è ipotizzato che anche alcuni virus come il citomegalovirus possano essere coinvolti. Nei vari stadi della sclerodermia il danno microvascolare precoce, gli infiltrati di cellule mononucleate e la progressiva fibrosi sono gli aspetti fondamentali; nelle fasi più avanzate prevalgono il notevole deposito di collagene nel derma, la perdita cellulare e l'atrofia (8) (9)

1.2.1 Alterazioni vascolari

Le alterazioni vascolari sono la più precoce manifestazione patologica della SSc e nonostante ci siano evidenze di processi riparativi, i capillari tendono a deteriorarsi nel tempo. Questo deterioramento comporta la rarefazione dei capillari e l'ispessimento delle pareti dei vasi sanguigni causato dalla proliferazione delle cellule endoteliali e muscolari lisce, e ciò determina un quadro di ipossia tissutale. (10)
Le cellule endoteliali una volta attivate producono molecole di adesione vascolari (VCAM 1), intercellulare (ICAM), E-selectina e VEGF, e confrontando i valori di questi marker tra i pazienti con SSc sistemica e pazienti con SSc non sistemica si è visto che nelle forme sistemiche sono molto più elevati. Da qui si presuppone una correlazione tra l'aumentata espressione di queste molecole di origine endoteliale ed il progressivo interessamento degli organi interni. (11) (12)
I ROS (specie reattive dell'ossigeno), che derivano dal processi del metabolismo cellulare a livello dei mitocondri, sembrano avere un ruolo chiave nel processo di fibrosi e di danno vascolare tipico della SSc. (13)
Il danno cellulare dato dai ROS avviene mediante interazione di queste specie reattive dell'ossigeno con DNA, proteine, lipidi, collagene e proteoglicani delle cellule. (14)
Altri fattori coinvolti nella patogenesi della SSc sono il fattore di crescita piastrinico (PDGF), il fattore di crescita endoteliale-vascolare (VEGF), il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), l'angiotensina II, l'IL-3, l'IL-6, il TNF-alfa, il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF); questi fattori possono generare ROS nelle cellule muscolari (lisce) dei vasi sanguigni, nei fibroblasti cardiaci, polmonari e cutanei per mezzo dell'attivazione del signalling associato alla famiglia delle NOX (nicotamide adenine dinucleotide phospate oxidase). (15)
Il fenomeno di Raynaud è la dimostrazione clinica di tutte queste alterazioni vascolari: consiste in un improvviso cambiamento di colore delle estremità correlato con l'esposizione a basse temperature. Più del 95% dei pazienti sclerodermici presenta questo fenomeno e circa il 15% di pazienti che hanno un fenomeno di Raynaud primario progrediscono ad un Raynaud secondario associato a SSc. Gli studi suggeriscono che il danno vascolare sia causato da una disfunzione dell'endotelio che causa uno squilibrio tra i fattori vasoattivi, tra cui una riduzione di NO e della prostaciclina, ed un aumento dell'endotelina-1. (16)

Durante la fase di riperfusione del fenomeno di Raynaud, i radicali liberi ed il NO portano alla formazione di perossinitrito, che determina l'apoptosi endoteliale ed il danno vascolare. È stata inoltre dimostrata la presenza di anticorpi diretti contro la laminina ed il collagene di tipo IV. (17)

1.2.2 Risposta infiammatoria ed immunitaria

L'alterazione della risposta immunitaria innata e adattativa ha un ruolo basilare nella SSc. Monociti e macrofagi sia circolanti che infiltrati nei tessuti, le cellule stromali e le cellule dendritiche plasmacitoidi presentano un'aumentata espressione di geni regolati dall'IFN, che riflette l'attivazione dei TLR, la cui attivazione è indotta da ligandi endogeni come immunocomplessi costituiti da acidi nucleici o DAMPs. (18)
Anche il tessuto fibrotico presenta un infiltrato di cellule immunitarie come i linfociti Th2 che secernono IL-4 ed IL-13, i macrofagi, i linfociti B attivati, i mastociti e le cellule dendritiche plasmacitoidi. Mentre l'IL-4 contribuisce alla sintesi di TGF-β e PDGF che sono coinvolti nel processo di fibrosi, mentre il ruolo dell'IL-13 rimane ancora poco chiaro. (19)
Di particolare rilevanza nella SSc è l'IL-6, una citochina prodotta da linfociti T, linfociti B, fibroblasti, fibrociti e cellule endoteliali: il recettore dell'IL-6 attiva la via JAK/STAT e MAPK e attiva i linfociti Th2, stimolando così la risposta infiammatoria e fibrotica. Alti livelli di IL-6 correlano con l'estensione della fibrosi cutanea e con una scarsa prognosi. Uno studio clinico eseguito su 16 pazienti ha dimostrato un miglioramento clinico della patologia a seguito di un trattamento con Tocilizumab, che è un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore dell'IL-6. (20)
Quasi la totalità dei pazienti con SSc presentano autoanticorpi circolanti: più comunemente sono diretti contro elementi nucleari e nucleolari, ma possono essere diretti anche contro recettori di superficie ed antigeni extracellulari come metalloproteinasi 1 e 3, fibrillina-1. Questi anticorpi non sono patognomonici ma sono importanti per la diagnosi e per la valutazione del coinvolgimento d'organo. (7) (9)
Alcuni anticorpi sono altamente specifici di SSc, tant'è da essere inclusi nei criteri di ACR/EULAR nel 2013: anti-Scl-70, anti-CENP e anti-RNA polimerasi III. Altri meno specifici invece sono: anti-U3-RNP/fibrillarina, anti-Th/To, anti-RNA polimerasi I/II ed anti-U11/U12 RNP. (5)

Gli anti-Scl-70 sono diretti contro la topoisomerasi I e sono associati alla forma diffusa di SSc e ad una peggiore prognosi: difatti i pazienti hanno un aumentato rischio di fibrosi polmonare severa e di coinvolgimento cardiaco. Gli anti-CENP sono anticorpi diretti contro il centromero, quelli più frequenti sono gli anti-CENP-B: questi sono associati alla forma localizzata di SSc e ad una migliore prognosi ma correlano con un alto rischio di ipertensione arteriosa. Gli anti-RNAP I e III spesso coesistono e sono più specifici di SSc: sono associati alla forma diffusa e ad un alto rischio di crisi renale. Gli anti-fibrillarina sono poco specifici e solitamente sono riscontrati nelle popolazioni afro-americane: sono associati alla forma diffusa ed all'interessamento renale e cardiaco. Gli anti Th/To legano due proteine del mitochondrial RNA processing e del complesso delle ribonucleasi: sono associati alla forma localizzata ed alla fibrosi polmonare. (21)

1.2.3 Fibrosi

La fibrosi, ovvero la deposizione di tessuto connettivo, fa parte del fisiologico processo di riparazione. Nella SSc invece si ha una risposta sregolata al danno tissutale. (22)
L'aspetto distintivo della sclerosi sistemica è il progressivo accumulo di matrice fibrosa costituita da collagene, elastina, glicosaminoglicani e fibronectina: questo comporta la presenza di cicatrici permanenti e la sostituzione della normale architettura tissutale con un tessuto connettivo denso e rigido, che conseguono alla fase di infiammazione vascolare. (7) (9)
Il tessuto fibrotico è caratterizzato dalla presenza di miofibroblasti α-SMA positivi (smooth muscle actin) e resistenti all'apoptosi: queste cellule secernono non solo matrice extracellulare, ma anche TGFβ e altri mediatori profibrotici, promuovendo ulteriormente l'accumulo di tessuto fibrotico. La differenziazione, il reclutamento, la proliferazione e l'attivazione dei fibroblasti sono controllati da fattori meccanici e da mediatori paracrini e autocrini. (23)
Studi recenti hanno dimostrato che i miofibroblasti attivati non derivino solo dai fibroblasti residenti, ma anche da altre cellule come cellule endoteliali, epiteliali e muscolari lisce. (24) (25)
Il TGFβ è riconosciuto come il principale regolatore della fibrosi: è secreto dai macrofagi e altre cellule come precursore inattivo legato alla TGFβ binding protein e depositato nella matrice extracellulare, per poi essere attivato tramite integrine. Il TGFβ promuove

la differenziazione dei miofibroblasti e la produzione di ROS. (26)
Il CTGF (connective tissue growth factor) è una proteina della matrice cellulare che collabora con il TGFβ nella risposta fibrotica: è poco espressa nei tessuti normali, ma è aumentata nel siero dei pazienti sclerodermici e la sua concentrazione correla con l'estensione cutanea e la fibrosi polmonare. TGFβ, endotelina 1 e angiotensian II sono potenti induttori di CTGF. (7) (27)
Anche il PDGF (platelet-derived growth factor) ha un ruolo nella fibrosi: è un peptide eterodimerico secreto da piastrine, macrofagi, cellule endoteliali e fibroblasti, che richiama le cellule mesenchimali. I pazienti sclerodermici mostrano una maggior espressione dei recettori PDGFRα e PDGFRβ a livello cutaneo e nel BAL. (7)
Inoltre sono stati individuati anticorpi circolanti contro il recettore del PDGF che stimolano l'attivazione dei fibroblasti e la produzione di ROS, attivando la via intracellulare Ha-Ras/ERK1/2 e inducendo un fenotipo sclerodermico nei normali fibroblasti umani. (15)

1.3 ASPETTI CLINICI

Le manifestazioni cliniche possono essere suddivise in base al processo patologico sottostante. La vasculopatia si manifesta con il fenomeno di Raynaud secondario, con alterazioni alla capillaroscopia, teleangectasie cutanee, ectasie vascolari dell'antro gastrico, crisi renali, ulcere digitali ed ipertensione arteriosa polmonare grave. L'infiammazione si manifesta con pleurite, pericardite, miosite, sinovite e alveolite. Infine la fibrosi si manifesta con sclerosi cutanea, malattia interstiziale polmonare e compromissione del tratto gastrointestinale. (28)

1.3.1 Fenomeno di Raynaud

Il fenomeno di Raynaud è tipico nei pazienti con malattie autoimmuni del tessuto connettivo ed ha un impatto significativo sulla qualità della vita dei pazienti. Oltre il 95% dei pazienti sclerodermici presenta il fenomeno di Raynaud. (29) (16)
Si manifesta con un episodico cambiamento di colore delle estremità, dato dal vasospasmo delle arterie periferiche conseguente all'esposizione a basse temperature e/o stress emotivi. È una delle prime manifestazioni osservate nei pazienti sclerodermici ed è utile per identificare i pazienti a rischio di sviluppare SSc. (30)
Il fenomeno di Raynaud è tipicamente suddiviso in tre fasi in base al diverso colore che

assume la cute: nella prima fase (ischemia) vi è pallore, nella seconda fase (deossigenazione) vi è cianosi e nella terza fase (riperfusione) vi è rossore. (31) Intorpidimento e cute fredda possono accompagnare il pallore e la cianosi, causati dalla mancanza di flusso sanguigno nel tessuto. Parestesie e dolore possono invece presentarsi durante la fase di riperfusione. Le manifestazioni progrediscono dalla punta delle dita alle falangi prossimali e hanno durata variabile, da pochi secondi a qualche ora. Una volta riperfusa, la cute torna al suo colore normale; tuttavia, dopo frequenti attacchi prolungati, la cute può cambiare per l'alterato metabolismo cellulare. (32)

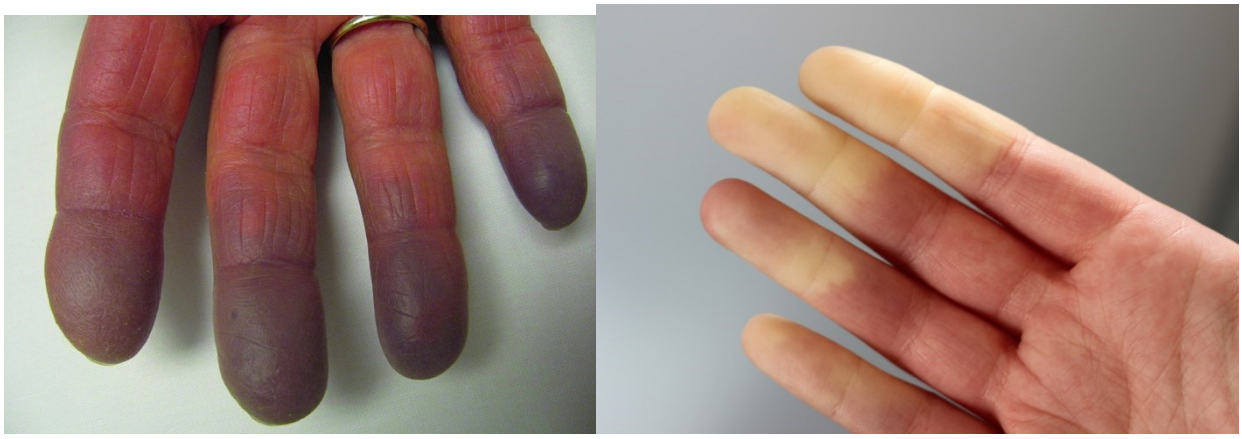


Figura 1. *Aspetti clinici in pazienti con fenomeno di Raynaud. A sinistra fase della cianosi; a destra fase del pallore digitale (33)*

Il fenomeno di Raynaud è comunemente suddiviso in primario e secondario: il primario non prevede nessuna causa sottostante, mentre il secondario è associato ad un'altra patologia o all'assunzione di alcuni farmaci. La forma secondaria è frequentemente associata alla SSc, ma anche ad altri disordini autoimmuni come LES (lupus eritematoso sistemico), dermatomiosite o crioglobulinemia. Si differenzia dalla forma primaria per la sua insorgenza più tardiva (dopo i 30 anni), la maggiore severità dei sintomi, l'assocazione con la presenza di anticorpi, le modificazioni dei capillari alla capillaroscopia e la comparsa di complicanze come le ulcere digitali. (34)

1.3.2 Manifestazioni cutanee

La SSc è una patologia caratterizzata da ispessimento, indurimento e tensione della cute. Nella forma diffusa l'estensione cutanea correla con una prognosi peggiore, con il

coinvolgimento viscerale e con l'aumento di disabilità. L'ispessimento della cute è dovuto alla deposizione di collagene e di matrice extracellulare nel derma e all'edema probabilmente causato da lesioni infiammatorie. Le mani tumefatte (puffy fingers) danno una sensazione di impaccio al movimento e risulta difficile pinzarne la cute. Successivamente la cute aumenta di consistenza, diventa tesa e aderente ai piani sottostanti (sclerodattilia), a tratti lucida. Infine diventa sottile e atrofica. (35)
Così Rodnan ha suggerito la suddivisione del coinvolgimento cutaneo in tre fasi: la fase edematosa che spesso ne è la prima manifestazione; la fase fibrotica, che può rapidamente seguire l'edema; e la fase atrofica, che compare quando la cute inizia ad assottigliarsi. (36)
L'ispessimento cutaneo comincia sempre dalle dita, estendendosi prossimalmente: come conseguenza la fibrosi può raggiungere le articolazioni, le dita tendono ad assumere un atteggiamento in semi-flessione e la mano ha l'aspetto ad artiglio. Le pieghe cutanee delle articolazioni tendono a scomparire e le falangi distali possono gradualmente ridursi con mutilazione delle dita dovuta al riassorbimento osseo (acroosteolisi). (37)
In uno stadio precoce, la sclerosi cutanea coinvolge anche il viso: la cute si indurisce, il volto è amimico, l'apertura della cavità orale si riduce (microstomia), il naso è più pronunciato e la cute è glabra. (38)
La microstomia è la principale manifestazione orale della SSc, presente nel 52-89% dei pazienti: ha un impatto importante sulle relazioni sociali, sulla masticazione, sui movimenti mandibolari e sull'igiene orale. Inoltre può determinare un'alta incidenza di infezioni del cavo orale. (39)
La xerostomia è un altro comune aspetto della SSc, è presente nel 32-42% dei pazienti e probabilmente è il risultato della fibrosi estesa alle ghiandole salivari: vi è maggiore suscettibilità alle carie e all'infezione da Candida. (40)



Figura 2. *:immagine a sin: ispessimento cutaneo e atteggiamento in flessione (mano ad artiglio). Immagine a dx: microstomia, teleangectasie e perdita dell'espressività del volto. (37)*

L'estensione della sclerosi cutanea nelle diverse regioni del corpo varia a seconda del tipo di SSc: nella forma limitata le alterazioni sono confinate a viso e collo, alle regioni distali degli arti superiori e inferiori; il coinvolgimento viscerale è un evento tardivo e si presenta 10-30 anni dopo la comparsa del fenomeno di Raynaud. Nella forma diffusa il coinvolgimento cutaneo è esteso anche al tronco, alle cosce e alla parte prossimale degli arti superiori; è rapidamente progressiva con un coinvolgimento viscerale più aggressivo e precoce. (41)
Le teleangectasie sono un segno presente in entrambe le forme, nel 40-70 % dei pazienti: sono delle venule postcapillari dilatate che scompaiono con la pressione digitale. Si trovano tipicamente su viso, labbra, mucosa orale e mani, ma si possono localizzare anche alla parte superiore del tronco e agli arti inferiori. (42)

1.3.3 Manifestazioni muscolo-scheletriche

Il coinvolgimento muscolo scheletrico è una delle principali cause della difficoltà ad eseguire le normali attività quotidiane nei pazienti sclerodermici. Recenti studi hanno dimostrato la correlazione tra queste manifestazioni e la lunga durata della malattia e il coinvolgimento d'organo: le alterazioni presenti sono l'acroosteolisi, la calcinosi, l'atteggiamento in flessione, l'erosione articolare, la riduzione dello spazio articolare e le

sublussazioni. Lo studio ha dimostrato una correlazione tra l'acroosteolisi e l'interstiziopatia polmonare; tra la calcinosi e l'ipertensione polmonare e il coinvolgimento gastrointestinale; tra l'atteggiamento in flessione e il coinvolgimento del tratto gastrointestinale. Altre associazioni sono risultate con il titolo anticorpale: l'acroosteolisi era più frequente nei pazienti anti-Scl70 positivi; la calcinosi nei pazienti anti-CENP positivi. (43)
L'acroosteolisi è l'accorciamento delle falangi distali secondario al riassorbimento osseo.Il meccanismo alla base è ancora incerto: le alterazioni vascolari, la rarefazione dei capillari e la conseguente ipossia sembrano avere un ruolo importante. (44)

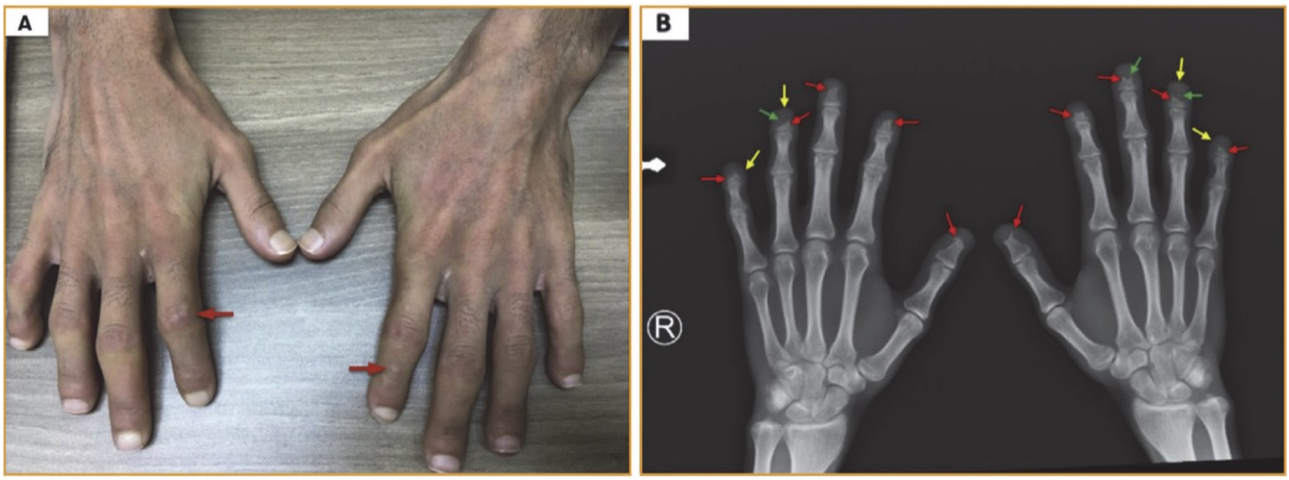


***Figura 3. Sin**: aree di calcificazione (frecce rosse). **Dx**: riassorbimento osseo delle falangi distali (frecce rosse), con piccole calcificazioni (frecce verdi) e pseudo clubbing, presentazione atipica e simmetrica del clubbing (frecce gialle). (45)*

La calcinosi sottocutanea è il deposito di cristalli di idrossiapatite localizzato tipicamente in zone sottoposte a microtraumi ricorrenti come i gomiti o le dita. È presente nel 25% dei pazienti sclerodermici ed è più frequente nella forma limitata di SSc. La calcinosi può essere superficiale e provocare delle ulcere cutanee con infezioni secondarie. (46)
La debolezza muscolare e la poliartrite sono comuni nei pazienti sclerodermici: hanno una resistenza ridotta negli arti superiori e inferiori, una forza muscolare ridotta negli arti inferiori e un ROM (range of motion) alterato nella spalla. Questi aspetti sono più accentuati nella forma diffusa di SSc. (47)

1.3.4 Manifestazioni gastroenteriche

Il tratto gastrointestinale è comunemente colpito dalla SSc: più del 90% dei pazienti ha

sintomi correlati alla dismotilità gastrointestinale, che può essere associata ad una elevata mortalità. (48)
Le immunoglobuline isolate dal siero di pazienti sclerodermici, interferiscono con la secrezione colinergica del tratto gastrointestinale: è un fenomeno più intenso all'inizio della patologia e più esteso nelle fasi successive, quando sono coinvolte sia le cellule della muscolatura liscia che i neuroni del plesso mioenterico. Questi anticorpi bloccano i recettori colinergici inibendo il rilascio di acetilcolina, impedendo così di rispondere agli stimoli. Inoltre i fibroblasti, una volta attivati in miofibroblasti dal TGFβ, producono un eccesso di collagene con danni alla parete e alterazione della motilità. (49)
Le alterazioni esofagee sono la complicanza più frequente (90% dei pazienti): rappresentano una delle prime manifestazioni della SSc e si possono presentare con disfagia, bruciore retrosternale e rigurgito. Sono conseguenti all'assenza di peristalsi (nel tratto distale dell'esofago in un terzo dei pazienti: scleroderma esophagus) e all'incompetenza dello sfintere esofageo inferiore. La manometria esofagea è il gold standard per la diagnosi. (50)
Le manifestazioni gastriche della SSc includono le ectasie vascolari con sanguinamenti e, più comunemente, la disfunzione elettrofisiologica, che porta ad un ritardato svuotamento gastrico con senso di sazietà precoce e gonfiore contribuendo al reflusso gastroesofageo. (51)
Il secondo tratto più colpito è il piccolo intestino: la ridotta secrezione gastrica e l'ipomobilità intestinale comportano una sindrome da iperproliferazione batterica (SIBO), presente in più del 50% dei pazienti con SSc. (52)
La cirrosi biliare primitiva è la patologia epatica più frequente: in particolare si associa alla forma limitata, con anticorpi anti-centromero positivi. È stato osservato che pazienti con sindrome da overlap (SSc e cirrosi biliare primitiva) hanno una progressione più lenta della patologia epatica rispetto ai pazienti con cirrosi biliare primitiva isolata. (53)
Il colon è coinvolto nel 20-50 % dei pazienti: vi è una ridotta motilità e un transito prolungato delle feci. I pazienti possono presentare stipsi, megacolon, volvolo del trasverso e del sigma, stenosi e diverticoli. (49)

1.3.5 Manifestazioni cardiache

La SSc è associata ad un'accelerata aterosclerosi, incrementando il rischio cardiovascolare. Fibrillazione atriale, flutter atriale e tachicardia sopraventricolare sono stati riportati nel 20-30 % dei pazienti sclerodermici: i disturbi della conduzione

sembrano essere correlati alla fibrosi del nodo del seno e delle branche. I disturbi valvolari sono rari. La fibrosi del miocardio è la manifestazione cardiaca più frequente. Il coinvolgimento pericardico include la fibrosi pericardica, le adesioni e le effusioni pericardiche. (54)

1.3.6 Manifestazioni renali

Il coinvolgimento renale si manifesta principalmente con la crisi renale sclerodermica (SRC): è un aumento della pressione arteriosa con insufficienza renale rapidamente progressiva che si presenta con oliguria, aumento di creatinina e azoto e anemia emolitica. Spesso è correlata con alte dosi di terapia corticosteroidea (>15 mg/dl) e si associa ad ipertrofia del ventricolo sinistro ed encefalopatia ipertensiva, che si manifestano con cefalea, dispnea, affaticabilità e offuscamento visivo. (55) (56)
La SRC compare tra il 5 e il 10 % dei pazienti con forma diffusa di SSc, spesso entro i primi 4 anni dall'esordio della patologia. Alte concentrazioni di anti-RNAP III sembrano correlare con la comparsa della crisi renale. (57)
La diagnosi precoce di SRC e l'utilizzo immediato di ACE inibitori sono salvavita e correlano con una miglior prognosi. Tuttavia, nonostante la terapia con ACE inibitori, un 60 % dei pazienti con SRC necessita della dialisi. (58)

1.3.7 Manifestazioni polmonari

I polmoni sono frequentemente coinvolti nella SSc, in particolare l'interstiziopatia polmonare (interstitial lung disease) è inclusa nei criteri classificativi ACR/EULAR con lo scopo di individuare i pazienti sclerodermici senza coinvolgimento cutaneo. L'ILD è associata con una mortalità precoce. (59)
Sono stati individuati dei fattori di rischio per l'ILD: forma diffusa di SSc, razza afro-americana, età avanzata all'esordio della patologia, durata della malattia più breve e la presenza di anticorpi anti-Scl-70 e/o assenza di anticorpi anti-CENP. Non sono dei fattori di rischio assoluti: l'ILD può insorgere anche in pazienti con forma limitata. (60) (61)
Sembra che il danno alle cellule endoteliali ed alveolari, l'attivazione della cascata coagulativa, inclusa la trombina e mediatori pro fibrotici, siano la causa iniziale dell'ILD. (62)
Alcuni pazienti hanno un lento declino della funzione polmonare, altri hanno un rapido

peggioramento valutabile tramite la TC ad alta risoluzione che evidenzia un quadro di polmonite interstiziale aspecifica (NSIP) con aree “a vetro smerigliato”, o tramite le prove di funzionalità respiratoria come la spirometria che mostra soprattutto una riduzione della DLCO. (63)
La manifestazione principale è la dispnea da sforzo; possono essere indicativi di ILD anche la tosse non produttiva, l’affaticamento e il dolore toracico. All’esame obiettivo del torace si possono auscultare crepitii velcro-like soprattutto alle basi polmonari. Tuttavia alcuni pazienti non presentano alterazioni all’esame obiettivo. (64)
Un’altra manifestazione è l’ipertensione arteriosa polmonare (PAH) con una prevalenza del 10-12%: essa consiste in un aumento della pressione arteriosa polmonare media al di sopra di 25 mmHg, con una pressione di incuneamento capillare normale, al di sotto di 15 mmHg, senza patologie del cuore di sinistra o tromboemboliche. (65)
È più frequente nei pazienti con forma limitata (46%) rispetto alla forma diffusa (26%); tuttavia la presenza di anticorpi anti-centromero non è un fattore predittivo dell’insorgenza di PAH.
La patogenesi è complessa e sembra essere dovuta alla vasculopatia obliterante riconducibile alla proliferazione delle cellule endoteliali, all’iperplasia delle cellule muscolari lisce e alla fibrosi della tonaca avventizia. (66)
La PAH si presenta con dispnea, astenia, sincope ed occasionalmente emottisi. La diagnosi è di esclusione e si basa su ECG, Ecocardiografia, TC, test di funzionalità respiratoria e scintigrafia polmonare, ma la conferma viene data dal cateterismo cardiaco destro. (67)

1.4 DIAGNOSI

La diagnosi di sclerosi sistemica tiene in considerazione i criteri classificativi ACR/EULAR del 2013. Il criterio maggiore è dato dall’ispessimento cutaneo delle dita di entrambe le mani prossimalmente alle articolazioni metacarpo-falangee. A questo si associano 7 criteri minori che sono: puffy fingers e/o sclerodattilia, lesioni delle estremità acrali, teleangectasie, anomalie dei capillari periungueali, ipertensione arteriosa polmonare e/o ILD, fenomeno di Raynaud e autoanticorpi correlati alla SSc (Tabella 1). Con un punteggio superiore a 9 il paziente viene classificato come paziente sclerodermico. (4)

Items	Sub-items	Weight / Score
Skin thickening of the fingers of both hands extending proximal to the metacarpophalangeal joints		9
Skin thickening of the fingers *(only count the highest score)*	Puffy fingers	2
	Whole Finger, distal to MCP	4
Finger tip lesions	Digital Tip Ulcers	2
(only count the highest score)	Pitting Scars	3
Telangiectasia		2
Abnormal nailfold capillaries		2
Pulmonary arterial hypertension and/or Interstitial lung Disease		2
Raynaud's phenomenon		3
Scleroderma related antibodies (any of anti-centromere, anti-topoisomerasel [anti-ScL 70], anti-RNA polymerase III)		3
	TOTAL SCORE^:	

Patients having a total score of 9 or more are being classified as having definite systemic sclerosis. ^ Add the maximum weight (score) in each category to calculate the total score.

Tabella 1. *Criteri ACR/EULAR 2013 per la diagnosi di sclerosi sistemica.*

Il mRSS (modified Rodnan Skin Score) è un metodo di valutazione dell'ispessimento cutaneo: valuta 17 differenti aree corporee, ad ognuna delle quali viene dato un punteggio da 0 a 3 (0 è l'assenza di ispessimento; 1 è l'ispessimento di grado lieve, 2 moderato, 3 severo). (68)

Subject ID: _____
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 4. *Scheda valutativa del mRSS*

Le indagini strumentali utilizzate per valutare il coinvolgimento d'organo sono:

- TAC torace ad alta risoluzione: questa metodica ha un'elevata sensibilità rispetto all'ordinaria radiografia, distingue le anomalie delle vie aeree da quelle del parenchima. Consente di valutare lo sviluppo di fibrosi polmonare e il deterioramento della funzione polmonare. (69)
  L'evidenza di fibrosi polmonare alla TC è presente tra il 55 e il 65% dei pazienti con SSc e in più del 96% dei pazienti con alterata funzione respiratoria. Si presenta con un ridotto volume polmonare, un pattern "ground glass" (vetro smerigliato) predominante e un pattern reticolare presente soprattutto alle basi polmonari. In alcuni casi di fibrosi in stadio avanzato si possono notare bronchiectasie da trazione e un pattern "a nido d'ape". (70)
- Spirometria: FVC (capacità vitale forzata) e DLCO (diffusione alveolo-capillare del monossido di carbonio) sono i markers diagnostici più importanti nelle ILD. La FVC identifica una patologia restrittiva, tipica della fibrosi; la DLCO indica un quadro di alveolite con alterazione della diffusione alveolo-capillare. Più del 40% dei pazienti con SSc mostra un pattern restrittivo moderato con FVC tra il 50 e il 70%, mentre un 15% dei pazienti presenta un pattern restrittivo severo con FVC inferire al 50%. La DLCO è ridotta tra il 55 e l'80% e si associa ad un pattern "ground glass" alla TC: una variazione di DLCO può verificarsi molto lentamente e richiedere diversi anni prima di manifestarsi. (71)
- Six Minutes Walking Test (6MWT): è un test semplice e non invasivo per valutare la tolleranza allo sforzo fisico. È stata dimostrata una correlazione tra la mortalità nei pazienti con fibrosi idiopatica polmonare e l'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica, ma non sembra avere questo ruolo nei pazienti con SSc in quanto le manifestazioni sistemiche della patologia (infiammazione articolare, debolezza e dolore muscolare) possono influenzare il test e l'interpretazione dei risultati. (72)
- Ecocardiografia: consente di misurare la pressione arteriosa polmonare sistolica (PAPs) per identificare l'ipertensione arteriosa polmonare.
- Capillaroscopia: è un esame non invasivo utilizzato per la diagnosi precoce di sclerodermia. Le alterazioni riscontrate includono le ectasie capillari, le microemorragie, la rarefazione capillare e la distorsione della normale struttura dei vasi. (73)
  Queste alterazioni sono conosciute come "scleroderma pattern" e sono state

classificate in 3 differenti sottotipi: “early” pattern che si presenta con megacapillari e microemorragie, “active” pattern in cui inizia la rarefazione e la ramificazione dei capillari, e infine “late” pattern in cui sono presenti aree avascolari (74).
Numerosi studi hanno dimostrato che “active” e “late” patterns sono associati ad un alto rischio di comparsa di malattia nei pazienti con una forma early SSc, confermando che la capillaroscopia è un esame fondamentale nell’identificare i pazienti a rischio di sviluppare sclerodermia (75).

1.5 PROGNOSI

La sclerosi sistemica è la patologia del tessuto connettivo con la più alta mortalità. La sopravvivenza dalla diagnosi è del 75% a 5 anni e del 62.5 % a 10 anni. (76) (77)
Da un’analisi recente del database dell’European Scleroderma Study and Research Group (EUSTAR) si evince che nei pazienti affetti la causa di morte è attribuibile alla SSc nel 57.6% dei casi. In media, i maschi muoiono in più giovane età e hanno un decorso più breve di malattia. Le principali cause di morte sono ILD, ipertensione arteriosa polmonare, cancro, malattia cardiovascolare e infezioni. (78)
Vi è un’associazione ben documentata tra SSc e neoplasie, in particolare quelle polmonari ed ematologiche. Secondo gli ultimi dati i pazienti con SSc hanno un rischio relativo (RR) pari a 1.75 (95% CI) di sviluppare cancro invasivo rispetto alla popolazione generale. (79)
Inoltre la positività per gli anticorpi anti RNA polimerasi III sembra essere correlata ad un rischio più alto di cancro in stretta relazione temporale con l’esordio della SSc, il che suggerisce un fenomeno paraneoplastico in questo subset di malattia. (80)
Gli studi attuali si propongono di individuare modelli prognostici in grado di predire più accuratamente l’outcome di ogni paziente in termini di progressione e mortalità. Per esempio, nella coorte EUSTAR è stato validato recentemente un modello semplice che stima la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi sulla base di cinque parametri: età, sesso maschile, proteinuria, VES elevata e ridotta DLCO. (81)

1.6 ASPETTI TERAPEUTICI

Al momento non esiste una terapia radicale o universale per la SSc, perciò il trattamento deve essere adattato ad ogni singolo paziente, in base alla severità clinica della patologia. (82)
Nel 2016 l'EULAR ha formulato 16 raccomandazioni specifiche per interessamento d'organo in termini di terapia della SSc, in aggiornamento alla prima versione datata al 2009. Queste indicazioni si pongono come integrazione del giudizio di un clinico esperto, che valuta le strategie terapeutiche disponibili in accordo con il paziente. (83)

1.6.1 Terapia delle complicazioni vascolari

L'obiettivo principale della terapia non farmacologica è quello di controllare il fenomeno di Raynaud, attraverso cambiamenti dello stile di vita, quali: evitare l'esposizione al freddo, ad eventi stressanti, nonchè a sostanze che possono esacerbare il vasospasmo, come il fumo di sigaretta e gli agenti simpatico-mimetici. (84)
La terapia farmacologica invece si basa sui calcio antagonisti diidropiridinici, che vengono usati nel lungo termine per ridurre la progressione della vasculopatia. Inoltre essi hanno mostrato un effetto protettivo sulla funzione renale, un miglioramento della perfusione miocardica e prevenzione della disfunzione ventricolare sinistra. I possibili effetti collaterali sono ipotensione, vertigini, flushing al volto, edemi e cefalea. (85) (86)
Gli inibitori selettivi della fosfodiesterasi PDE-5 agiscono sul pathway dell'ossido nitrico, riducendone la degradazione; sono usati con modesta efficacia nel fenomeno di Raynaud secondario, per la guarigione di ulcere acrali attive e la prevenzione di nuove ulcere. (87)
Gli analoghi della prostaciclina, in particolare l'iloprost per via endovenosa, devono essere considerati nei casi di fenomeno di Raynaud con attacchi severi e nel trattamento delle ulcere acrali in pazienti non responsivi alla terapia orale. (88)
Infine il Bosentan, un antagonista recettoriale dell'endotelina 1 (ET-1), viene usato per ridurre il numero di ulcere digitali nei pazienti non responsivi alle altre terapie. (89)

1.6.2 Terapia delle complicanze gastro-intestinali

Il reflusso gastroesofageo è molto comune e può verificarsi in assenza di sintomi, perciò tutti i pazienti con SSc devono essere trattati. Le principali misure da adottare a domicilio sono: dormire in posizione rialzata, fare pasti piccoli e frequenti, evitare

l'assunzione di cibo subito prima di coricarsi e ridurre i grassi nella dieta. Tuttavia, data in genere la severità del quadro nei pazienti con SSc, tale approccio non è sufficiente se adottato in assenza di terapia farmacologica. (90)
Gli inibitori di pompa protonica (PPI) devono essere prescritti per il trattamento del reflusso gastroesofageo e la prevenzione delle complicanze dell'esofagite cronica, quali ulcere e stenosi esofagee. (91)
Gli esperti raccomandano inoltre l'uso di farmaci procinetici, come il domperidone e la cisapride, per la gestione dei disturbi sintomatici della motilità del tratto gastroenterico, tra i quali figurano: disfagia, sazietà precoce, gonfiore addominale e pseudo-ostruzione intestinale. Infine il ricorso a cicli intermittenti di antibiotici ha mostrato un miglioramento dei sintomi nei pazienti con *small intestinal bacterial overgrowth* (SIBO). (92) (93)

1.6.3 Terapia delle complicanze renali

La crisi renale sclerodermica (SRC) è un'emergenza medica che deve essere riconosciuta e trattata tempestivamente. Gli ACE inibitori rappresentano una prima linea terapeutica efficace se somministrati all'insorgenza della SRC. Grazie all'introduzione di questi farmaci nei pazienti con SRC la mortalità a 6 mesi si è ridotta dall'85% al 25%. L'effetto principale è la normalizzazione della pressione arteriosa; tuttavia in alcuni casi può essere necessario ricorrere alla dose massima e in secondo luogo aggiungere un calcio antagonista diidropiridinico e/o un diuretico. (94)
Nonostante la terapia, fino al 50% dei pazienti sviluppa l'*end-stage renal disease* (ESRD), che richiede la dialisi peritoneale a lungo termine o l'emodialisi. (95)
Inoltre il trapianto di rene ha dimostrato un vantaggio di sopravvivenza e può essere preso in considerazione in pazienti selezionati dopo almeno 18-24 mesi dall'inizio della dialisi. (96)

1.6.4 Terapia delle complicanze polmonari

Nelle ultime raccomandazioni riguardanti l'ipertensione arteriosa polmonare (PAH), è stata approvata una terapia di combinazione con antagonisti del recettore dell'ET-1 (ambrisentan, bosentan e macitentan), inibitori di PDE-5 (sildenafil, tadalafil) e riociguat,

che stimola la guanilato ciclasi solubile nel pathway dell'ossido nitrico. (83)
L'infusione endovenosa continua di epoprostenolo, un analogo sintetico della prostaciclina, può essere considerata nei pazienti con PAH severa (classe III e IV), in quanto determina un miglioramento della tolleranza all'esercizio fisico, della classe funzionale e dei parametri emodinamici. (97)
Non è stata ancora approvata invece alcuna terapia veramente efficace per trattare e prevenire l'interstiziopatia polmonare (ILD). L'EUSTAR suggerisce l'utilizzo di terapia immunosoppressiva con ciclofosfamide, specialmente per i pazienti con ILD in progressione. Da studi più recenti emerge anche il ruolo degli agenti anti-fibrotici pirfenidone e nintedanib, che sono raccomandati nel trattamento della fibrosi polmonare idiopatica (IPF) per rallentare la progressione di malattia e ridurre la mortalità. ILD e IPF infatti presentano alcuni aspetti patogenetici in comune, sebbene differiscano per storia naturale, caratteristiche cliniche, gestione e outcome. (83) (98)
Il pirfenidone è una molecola sintetica che tra i tanti effetti ha quello di regolare l'attività del TGF-β e del TNF-α. Il nintedanib è un inibitore della tirosin-chinasi intracellulare che si lega ai recettori di FGF, VEGF e PDGF. Entrambi i farmaci hanno mostrato attività antifibrotica e anti-infiammatoria in modelli animali, nonché una certa sicurezza ed efficacia nel trattamento dell'ILD associata a SSc, come risulta da alcuni trials clinici. (99)
La gestione del paziente con ILD include anche strategie non farmacologiche quali: cessazione dell'abitudine tabagica, profilassi delle infezioni, riabilitazione polmonare e ossigenoterapia. In particolare la supplementazione di ossigeno deve essere prescritta nei pazienti con bassi valori di saturazione a riposo e in quelli che desaturano con la deambulazione. (100)

1.6.5 Terapia immunosoppressiva

Gli agenti immunosoppressivi usati nel trattamento di altre patologie autoimmuni o malattie del tessuto connettivo, hanno mostrato in genere effetti modesti nella SSc.
I glucocorticoidi sono ampiamente prescritti ai pazienti con SSc in combinazione con altri farmaci per il trattamento di ILD, malattia cutanea diffusa, miosite e manifestazioni muscolo scheletriche. (101)
Il loro potenziale beneficio deriva dall'azione antiinfiammatoria, insieme alla capacità di ridurre la permeabilità vascolare e l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali. Tale effetto si traduce in un miglioramento

dei sintomi, senza però alcun impatto sulla progressione di malattia. (102)
I glucocorticoidi inoltre possono aumentare il rischio di crisi renale sclerodermica (SRC) e perciò dovrebbero essere introdotti solo quando necessari e a bassi dosaggi. (103)
La ciclofosfamide (CYC) è un agente alchilante e un potente immunosoppressore che causa la morte delle cellule linfocitarie. Nonostante la sua efficacia dimostrata nel trattamento dell'ILD associata a SSc, l'uso della CYC è limitato dalla potenziale tossicità. Il farmaco per via endovenosa ha un profilo di sicurezza più favorevole rispetto alla CYC orale, che invece si associa a un rischio aumentato di cistite emorragica, neoplasie solide ed ematologiche, infezioni gravi e insufficienza gonadica. (104) (105)
Il metotrexate (MTX) fa parte dei *Disease Modifying Antirheumatic Drugs* (DMARDs) ed è l'unico farmaco di questa classe introdotto nelle raccomandazioni EULAR 2016. IL MTX deve essere considerato per il trattamento delle manifestazioni cutanee nella forma di early dSSc. Esso è utile anche nei casi di artrite infiammatoria associata a SSc, con somministrazione sottocutanea a causa dell'elevata frequenza di malassorbimento.
Possibili effetti collaterali includono: epatotossicità, pancitopenia e, secondo alcuni studi, l'induzione di danno polmonare. (96)
Il micofenolato mofetile (MMF) è un profarmaco dell'acido micofenolico. Come il MTX, è un DMARD sintetico e ha un potente effetto citostatico sulla funzione linfocitaria. Negli studi osservazionali, il MMF ha mostrato risultati incoraggianti come: miglioramento dello score cutaneo, frequenza più bassa di fibrosi polmonare e aumentata sopravvivenza a 5 anni. (106) (107)
Il rituximab (RTX) è un DMARD biologico costituito da un anticorpo monoclonale che lega il recettore CD20 dei linfociti B. Diversi studi hanno valutato il RTX come terapia "*rescue*" per l'ILD severa e progressiva, in seguito a fallimento della terapia immunosoppressiva convenzionale. (108)
Il RTX ha dimostrato un profilo di sicurezza accettabile, tuttavia è importante una stretta sorveglianza per l'insorgenza di infezioni opportunistiche, come quelle da Pneumocystis jirovecii e citomegalovirus. (109)
Tocilizumab (TCZ) è un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore dell'IL-6, una citochina pro-infiammatoria importante nella patogenesi della malattia. In un recente trial clinico controllato con placebo, il TCZ sottocute ha determinato nei pazienti un miglioramento dello score cutaneo, delle manifestazioni articolari e, in misura minore,

della capacità vitale forzata. (20)

Le immunoglobuline endovena (IVIG) si sono dimostrate efficaci come terapia alternativa dell'interessamento muscolo-scheletrico, gastro-intestinale e in alcuni casi sono state associate anche a riduzione dello score cutaneo. Hanno mostrato inoltre un effetto positivo sulle ulcere digitali, sulla calcinosi e sui *tendon friction rubs*. I meccanismi principali con cui agiscono le IVIG sono una modulazione dell'infiammazione e della fibrogenesi, nonché la neutralizzazione degli autoanticorpi patogenetici. (110)

Il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (HSCT) è emerso recentemente come opzione terapeutica nei pazienti con forme di SSc rapidamente progressiva e a rischio di insufficienza d'organo. In relazione agli effetti collaterali e alla mortalità posttrattamento, i pazienti candidabili alla procedura devono essere accuratamente selezionati. Il meccanismo d'azione dell'HSCT è probabilmente riconducibile ad ablazione o riduzione delle cellule aberranti del sistema immunitario, seguita da ricostituzione di un nuovo sistema auto-tollerante. Nei pazienti sottoposti al trapianto si è verificato in genere un miglioramento dell'interessamento cutaneo e una stabilizzazione della funzione polmonare, come pure in alcuni casi un aumento della sopravvivenza libera da eventi rispetto alla terapia con ciclofosfamide. (96) (111)

2. CD38: UN POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO

2.1 L'ASSE CD38/CD39/CD73/CD203a ED IL SUO RUOLO NELL'OMEOSTASI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

L'adenosina (ADO) è un nucleoside in grado di agire come molecola immunosoppressiva, attraverso l'inibizione delle funzioni di diverse popolazioni cellulari e sottogruppi del sistema immunitario, compresi i linfociti T, i linfociti B, le cellule NK, le cellule dendritiche, i monociti, e i macrofagi. (112) (113)
ADO è prodotta attraverso l'azione degli ectoenzimi adenosinergici espressi sulle membrane di diverse popolazioni cellulari e può essere ottenuta metabolizzando l'ATP (percorso canonico) o il NAD+ (percorso alternativo). Il percorso canonico è avviato da CD39, un ectonucleoside trifosfato difosfoidrolasi (NTPDase), che converte ATP in ADP. Il CD39 può anche convertire quest'ultima molecola (ovvero l'ADP) in AMP che viene completamente defosforilata in ADO dalla 5′-nucleotidasi (5′-NT) CD73. (114)
È stato inoltre recentemente dimostrato che ADO può essere generata dal substrato NAD+ attraverso un percorso alternativo, dove CD38 (una NADasi e ADP-ribosil ciclasi) gioca un ruolo centrale. Essa converte infatti NAD+ in adenosina difosfato ribosio (ADPR), che a sua volta viene metabolizzata in AMP da CD203a/PC-1 (ectonucleotide pirofosfatasi fosfodiesterasi 1). CD203a/PC-1 può anche convertire ATP in AMP, che alla fine è degradato in ADO da CD73, una molecola condivisa tra i due percorsi. (115) (116)
I livelli di ADO possono essere regolati da meccanismi intracellulari ed extracellulari, attraverso l'azione di trasportatori nucleosidici, ovvero trasportatori di nucleosidi equilibrativi (ENT1, ENT2, ENT3 e ENT4) e trasportatori di nucleosidi concentrativi (CNT1, CNT2 e CNT3), che sono in grado di trasportare ADO all'interno delle cellule (117) (118); ed attraverso l'adenosina deaminasi (ADA1 e ADA2), che è espressa da diverse popolazioni cellulari ed è in grado di convertire ADO in inosina. (119) (120)
Tuttavia, l'inosina può anche indurre effetti immunosoppressivi, attraverso l'interazione con il recettore A2a. (121)
Gli ectoenzimi adenosinergici sono presenti sulla superficie di diverse popolazioni di cellule regolatrici. Ad esempio, le cellule T regolatrici CD4+ - CD25highFOXP3 +

esprimono alti livelli di CD39 e CD73. Si ritiene che l'ADO prodotta possa essere determinante nell'abrogare le funzioni delle cellule T effettrici dopo aver interagito con ADORA2A.

L'effetto inibitorio può essere contrastato dai linfociti T effettori attraverso l'attività dell'ADO deaminasi (ADA). ADA, che è responsabile della degradazione dell'adenosina, è ospitato su CD26, una glicoproteina legata alla superficie cellulare. (122)

Inoltre, le cellule NK CD56brightCD16− svolgono più ruoli nella regolazione della risposta del sistema immunitario. *È* stato recentemente dimostrato che le cellule NK CD56brightCD16− esprimono alti livelli di CD39, CD73, CD203a/PC-1, e CD157, rispetto al sottogruppo NK CD56dimCD16+. Inoltre, le cellule NK CD56brightCD16− producono ADO e hanno la capacità di inibire la proliferazione delle cellule T CD4 + autologhe. Il CD38 sembra avere un ruolo centrale in questo processo. (123)

Un altro importante sottoinsieme di cellule regolatrici è rappresentato dai linfociti T regolatori di tipo 1 (Tr1) CD45R0+CD4+CD49b+LAG-3+. Recentemente è stato dimostrato che il CD39 promuove la differenziazione cellulare di Tr1 consumando l'ATP extracellulare. Ancora più importante, il CD39 è espresso sulle cellule Tr1 e contribuisce alla loro attività soppressiva attraverso la generazione di ADO in modo discontinuo. Infatti, il CD73, l'altro componente del percorso classico per la produzione di ADO, è espresso dai linfociti T piuttosto che dai linfociti Tr1. (124)

Le cellule regolatrici sono presenti anche tra i linfociti B. Una sottopopolazione di cellule B, caratterizzata dai marker CD39+ CD73+, genera ADO, ed è dotata di proprietà regolatorie. (125) Inoltre, le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) e le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono popolazioni con funzioni regolatorie, caratterizzate dalla presenza di ectoenzimi adenosinergici. Uno studio recente suggerisce che le MDSC CD11b+CD33+ nel sangue periferico e nei tessuti tumorali dei tumori polmonari non a piccole cellule (NSCLC) esprimano le ectonucleotidasi di superficie CD39 e CD73. Tale espressione è correlata agli effetti immunosoppressivi e chemoprotettivi di MDSC, che favoriscono la progressione del NSCLC. (126)

Si ipotizza che l'ADO nel midollo osseo causi un impedimento della risposta immunitaria antitumorale. Lo stesso studio ha sottolineato che le cellule staminali mesenchimali esprimono anche CD38, CD157 e CD203a/PC-1. (127)

Altre segnalazioni hanno confermato la presenza di CD39 e CD73 nelle cellule staminali mesenchimali. Queste cellule possono portare alla generazione di ADO quando le

concentrazioni di ATP sono elevate, come nel caso delle lesioni ai tessuti. Tuttavia, questo si ottiene solo con la cooperazione dei linfociti T attivati, che esprimono alti livelli di CD39. (128)
D'altra parte, altri lavori hanno dimostrato che le cellule staminali mesenchimali derivate dal cancro esprimono CD39 e CD73 funzionali, di per sé in grado di produrre ADO e quindi di sopprimere le funzioni delle cellule T.
Alla luce di queste osservazioni, Malavasi et al hanno sfruttato un modello modulare di linfociti T umani per dimostrare che la produzione di adenosina da NAD+ può essere mediata da una rete di ectoenzimi che coinvolgono CD38 così come pirofosfatasi / fosfodiesterasi ecto-nucleotide 1 (NPP1, meglio noto come CD203a o PC-1) e CD73.
La caratteristica funzionale principale di questo asse di segnalazione adenosinergica che lo distingue dalle vie canoniche dell'ectonucleotidasi è la sua indipendenza dal CD39.
Infatti, NAD+ è idrolizzato da CD38 che genera anche adenosina difosfato ribosio (ADPR) direttamente o tramite cADPR. (129)
Il CD203a è in grado di idrolizzare sia NAD+ che ADPR per produrre AMP. (130) (131)
Di conseguenza, i flussi NAD+ fluiscono attraverso una cascata ectonucleosidasica che coinvolge CD73 culminando nella formazione di adenosina immunosoppressiva. (132) (133)
A sua volta, l'adenosina può legarsi a specifici recettori purinergici P1 e questi provocano segnali immunosoppressori aumentando i livelli di cAMP. (134) (135)
Questi ectoenzimi possono lavorare come parte di un percorso continuo (molecole su la stessa cellula) o discontinuo (molecole su cellule diverse). Quando le singole componenti si trovano su cellule diverse, le loro interazioni sono facilitate in sistemi (o nicchie) spazialmente limitati. I linfociti T esercitano un ruolo chiave nella generazione della tolleranza nell’infiammazione, nel cancro e nel trapianto. (136) (137)
Quindi, il percorso CD38 / CD203a / CD73 può rappresentare uno delle multiple strategie adottate dalle cellule tumorali per sfruttare i normali meccanismi per la tolleranza periferica per eludere l'attività antitumorale dell'ospite in sistemi spazialmente ristretti. (138) (139)
Interventi mirati nei confronti di questo percorso possono essere determinanti per ripristinare l'immunosorveglianza. (140)

2.2 IL CD38 DALLA RICERCA ALLA CLINICA: FOCUS SUL MIELOMA MULTIPLO

Il mieloma multiplo (MM) è la seconda neoplasia maligna più comune in ematologia ed è considerato il risultato di pressioni selettive su diversi cloni cellulari di plasmacellule maligne (mPC), che crescono in una nicchia ipossica nel midollo osseo (BM). (141) (142) (143) Quando il consumo di ossigeno supera la sua fornitura dal sistema vascolare, l'ambiente tumorale ipossico favorisce le vie molecolari che alimentano l'aggressività del tumore. (144) (145) Il rapporto incrociato tra le distinte componenti cellulari della nicchia chiusa del midollo ossea genera adenosina extracellulare (ADO), promuovendo così la sopravvivenza cellulare del tumore. (146) (147) Ciò si verifica tramite il legame di ADO con i recettori purinergici, che portano alla formazione di complessi che funzionano come segnali autocrini / paracrini con attività di regolazione immunitaria.

L'ATP, il NAD+ ed il cAMP sono le principali molecole puriniche intracellulari che servono come principali substrati adenosinergici nel microambiente tumorale extracellulare (TME) per la generazione di ADO. (148) (149)

La conversione adenosinergica, che può variare in modo significativo secondo l'ambiente metabolico, è sfruttata dalle plasmacellule maligne per migrare e tornare in una nicchia protetta e per eludere la risposta immunitaria. (141)

L'espressione di più recettori ADO P1 specifici (150) completano il profilo di una complessa rete normativa, i cui segnali sono tradotti in (i) down-regolazione delle funzioni della maggior parte delle cellule effettrici sistema immunitario ed (ii) il potenziamento dell'attività delle cellule che sopprimono le risposte immunitarie antitumorali.

Entrambi gli effetti facilitano la fuga delle plasmacellule maligne dalla sorveglianza immunitaria. Una visione traslazionale di questi risultati suggerisce che le concentrazioni di ADO finemente sintonizzate nella nicchia del mieloma nel midollo osseo (151), contribuiscano alla sintomaticità del mieloma multiplo tra i pazienti con gammopatia monoclonale asintomatica di significato indeterminato (MGUS) e con mieloma multiplo di tipo smouldering (SMM). (152) (153)

La nicchia del midollo osseo fornisce un habitat ipossico per le interazioni tra le

plasmacellule maligne e le cellule residenti immunitarie non tumorali e le residenti non immunitarie, producenti elementi operativi funzionali, o cosiddetto purinoma (ad es. canali e trasportatori nucleotidici, sottoprodotti dei nucleotidi, ectoenzimi catabolizzanti nucleotidi, reti molecolari di nucleotidi e proteine del recettore nucleosidico).
La loro connessione fisica è mediata dal liquido plasmatico, che collega le diverse componenti cellulari del purinoma (Figura 5).

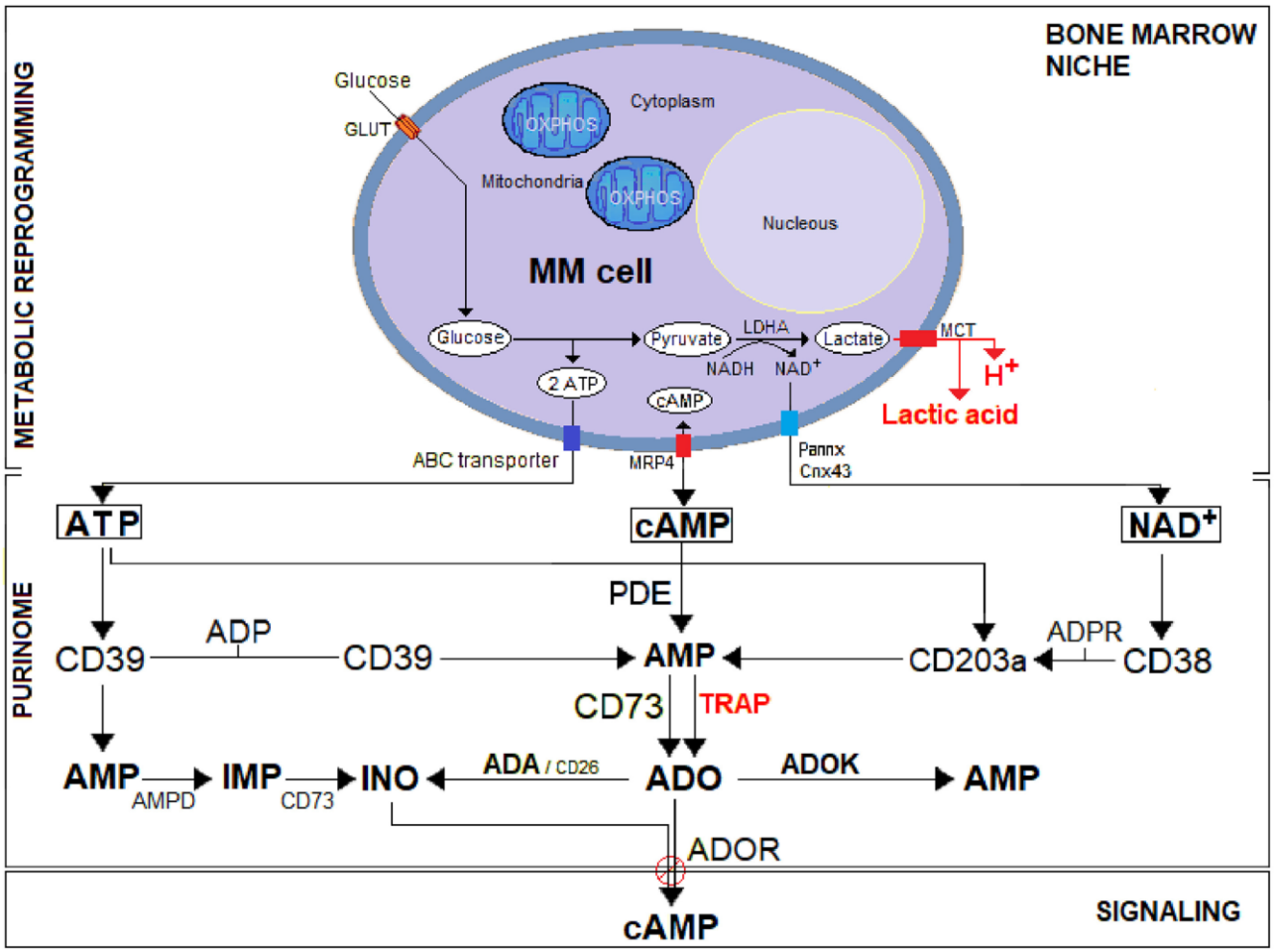


Figura 5. *Rappresentazione schematica del purinoma*

Per la loro espansione progressiva, le plasmacellule maligne superano la nicchia ipossica attraverso un processo di riprogrammazione metabolica basato sul dirottamento dei meccanismi molecolari delle cellule normali per creare un esclusivo frame immunosoppressivo.
L'adattamento metabolico della componente cellulare della nicchia del midollo osseo induce un programma glicolitico HIF1a-dipendente, che aumenta l'espressione di CD73 e di ADOR. (154)
Come mostrato nella Figura 1, dopo aver consumato glucosio ad una velocità maggiore rispetto alle cellule normali, le cellule MM secernono la maggior parte dei sottoprodotti

derivati come acido lattico, un fenomeno noto come "Effetto Warburg". (155)
Allo stesso tempo, la generazione di acido lattico e protoni (H+) provocano un accumulo di acido all'interno delle cellule del mieloma multiplo.
L'aggiustamento metabolico intracellulare viene neutralizzato dalla sovraespressione di un trasportatore monocarbossilato (MCT), risultante in un co-trasporto di acido lattico legato a H+ attraverso la membrana plasmatica, con maggiore acidità extracellulare, nota come acidosi lattica (Figura 1).
Il purinoma sfrutta la nicchia metabolicamente riprogrammata per generare ADO extracellulare che è prodotto localmente da una rete multicellulare. L'ADO porta alla crescita del tumore e distorce le cellule immunitarie verso un fenotipo immunosoppressivo. (156)
Le cellule residenti del midollo osseo esprimono costitutivamente un insieme completo di ectonucleotidasi sulla superficie cellulare che, diffuse su cellule diverse, guidano la produzione di ADO sotto stress metabolico (ad es. ipossia). (157) (158)
Si ritiene anche che ADO possa modulare la comunicazione tra le plasmacellule maligne e quelle normali, contribuendo allo stato immunocompromesso dei pazienti con il mieloma multiplo. (159)
Poiché è il principale substrato per le ectonucleotidasi nel processo di generazione di ADO immunosoppressiva, l'ATP coinvolge il tandem canonico CD39/CD73 nella creazione di un ambiente tumorale anergico. (160) (161)
Vi sono però alcuni dubbi sulla capacità di questo percorso classico di funzionare in sistemi chiusi (ad esempio, la nicchia nel midollo osseo) in vivo. Ad esempio, il pH ottimale per l'enzima CD39 è nel range alcalino compreso tra 8 ed 8,3. (162) Questo potrebbe precludere l'attività enzimatica del CD39 in un microambiente tumorale extracellulare ipossico, dove è presente un pH acido secondario ad acidosi lattica. (163)
Inoltre, la conversione di ATP extracellulare in ADO come catalizzato da CD39 è cineticamente complessa, con il metabolita ADP a monte generato in alti livelli di ATP del microambiente tumorale extracellulare, che agisce come un inibitore del feed-forward di CD73. (164)
Inoltre, il fatto che CD203a abbia un'affinità inferiore per ATP rispetto a CD39 supporta l'idea che il tandem ectoenzimatico alternativo CD38 / CD203a che utilizza NAD+ come substrato (Figura 1) possa diventare un produttore rilevante di AMP finalizzato alla produzione di ADO nella nicchia del midollo osseo.
In condizioni fisiologiche, la ripartizione extracellulare di ATP segue la via

adenosinergica convenzionale: ATP / ADP / AMP / ADO.
Tuttavia, in condizioni patologiche, l'elevata concentrazione di ATP nel microambiente tumorale extracellulare induce la AMP deaminasi (AMPD) a convertire AMP in inosina monofosfato (IMP), che a sua volta viene defosforilata dal 5′-NT / CD73 in inosina (INO) (Figura 1). (165)
Il percorso IMP (ATP / AMP / IMP / INO), che in origine si pensava potesse essere trovato principalmente nel compartimento cellulare citosolico (166), è stato recentemente rilevato nel midollo osseo dei pazienti con mieloma multiplo e neuroblastoma. (143)
Vi sono altri substrati alternativi (cioè, NAD+, cAMP) per la produzione di ADO nella nicchia del mieloma multiplo (Figura 1). Componenti principali di questa via alternativa sono CD38, CD203a e CD73.
Non è completamente chiaro se il percorso alternativo e il percorso canonico (CD39 / CD73) funzionino in modo cooperativo o se l'espressione relativa delle ectonucleotidasi determini quale via è più attiva nella nicchia del midollo osseo ipossico. Certo è che la riprogrammazione metabolica nella nicchia del midollo osseo porta a un microambiente tumorale extracellulare acido. È quindi ragionevole credere che la via dipendente da CD38 abbia un ruolo compensatorio per l'attività del CD39 in un ambiente midollare acido.
Che siano il percorso principale o quello alternativo a determinare la maggiore produzione di ADO, il risultato è che l’accumulo extracellulare di ADO media i segnali legandosi alla proteina P1-G accoppiata agli ADOR purinergici (A1, A2A, A2B e A3) espressi da cellule diverse, inclusi effettori immunitari. (167)
I diversi livelli di ADO nei campioni di plasmacellule midollari analizzati probabilmente riflettono: (i) la variabilità del numero di ectoenzimi e delle loro attività a seconda del pH ambientale (168); (ii) la loro tendenza ad essere mutati nei fluidi biologici. (169)
Inoltre, (iii) molte di queste molecole sono geneticamente polimorfiche, il che ne influenza funzione. Ad esempio, l'espressione di CD38 è regolata da un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) situato nell'introne 1 (rs6449182; variazione C> G). (170)
L'accumulo di ADO nella nicchia del midollo osseo tramite gli assi CD38 / CD203a / CD73 e CD39 / CD73 funziona in sequenza attraverso interazioni mPC / BMSC / OC. (159)
Elevati livelli di ADO hanno inoltre una potente azione stimolatrice sulla secrezione di interleuchina-6 (IL-6) da parte delle BMSC. (171) (172) Poiché IL-6 è importante per la

normale funzione degli osteoblasti, il targeting delle vie del segnale di IL-6 può alterare l'equilibrio tra il riassorbimento e la formazione ossea. Per questo motivo, le interazioni tra le plasmacellule maligne e OB nella nicchia del midollo osseo contribuiscono allo sviluppo di lesioni osteolitiche nel mieloma multiplo. (173) Inoltre, anche IL-6 è coinvolto nella proliferazione e sopravvivenza delle plasmacellule maligne e nella progressione della malattia. (173) (174)

Studi recenti su pazienti affetti da mieloma multiplo (175) (176) hanno dimostrato che i livelli di ADO nei campioni di plasmacellule midollari alla diagnosi erano più alti nei pazienti con mieloma multiplo sintomatico in stadio avanzato (ISS = III) rispetto a quelli nelle fasi precedenti MGUS / SMM (ISS aggregato = III). (168)

Questi risultati supportano l'ipotesi che la produzione di ADO nella nicchia midollare sia correlata alla progressione della malattia e potrebbe pertanto essere utile come marker prognostico per la stadiazione del MM insieme ad altri marker, come l'aumento della beta2-microglobulina e la diminuzione dell'albumina sierica. (177)

Dal momento che CD38 è espresso a diversi livelli sulle plasmacellule maligne in tutti i pazienti con mieloma multiplo, è stato ipotizzato che il blocco di tale enzima possa essere efficace nel trattamento di tale neoplasia. (178) (179)

Il CD38 è un obiettivo ideale per il trattamento del MM con anticorpi monoclonali alla luce del suo pattern espressivo durante l'ontogenesi. (180) (181) Infatti, non solo il CD38 non è espresso dai precursori ematologici precoci (182), ma la sua espressione, tipica delle cellule adulte, viene mantenuta anche dalle cellule maligne.

Il Daratumumab è stato il primo anticorpo terapeutico anti-CD38 ad essere approvato per l'uso clinico (183) (184). In vitro, esso inibisce l'attività ciclasica di CD38, mentre sembra migliorare l'attività enzimatica dell'idrolasi. (185)

L'efficacia del daratumumab nei pazienti con MM è stata dimostrata in diversi trial clinici randomizzati.

Nel primo di questi studi, l'aggiunta di daratumumab a lenalidomide e desametasone ha allungato significativamente la sopravvivenza libera da progressione tra i pazienti con mieloma multiplo recidivante o refrattario. Il daratumumab è stato associato a reazioni correlate all'infusione e ad un tasso più elevato di neutropenia rispetto alla terapia di controllo, ma non sono stati osservati effetti avversi inattesi o severi. (186)

Altri studi hanno confermato l'efficacia e la sicurezza del daratumumab in combinazione alle terapie convenzionali. (187) (188) (189)

L'attività anti-mieloma di daratumumab viene esercitata attraverso diversi meccanismi:

diretti, Fc-dipendenti e immunomodulatori. Gli effetti diretti sono mediati dall'inibizione della trasduzione del segnale intracellulare e dall'inibizione dell'attività enzimatica CD38, che porta a livelli ridotti di adenosina immunosoppressiva. I meccanismi dipendenti da Fc includono la citotossicità dipendente dal complemento (CDC), citotossicità cellulare dipendente da anticorpi (ADCC), fagocitosi cellulare dipendente da anticorpi (ADCP), e induzione dell'apoptosi attraverso il cross-linking tramite il recettore Fcγ. Inoltre, daratumumab esercita effetti immunomodulatori aumentando la produzione di cellule T helper e citotossiche e esaurendo le cellule immunosoppressive che esprimono CD38 come le cellule T regolatorie (Treg) e le cellule B e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) (190)

2.3 IL RUOLO DEL CD38 NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

Le malattie autoimmuni sono condizioni croniche che si sviluppano in seguito alla perdita di tolleranza immunologica nei confronti di auto-antigeni e rappresentano un gruppo eterogeneo di disturbi che affliggono specifici organi bersaglio o più organi e apparati. La funzione di base del sistema immunitario umano è quella di distinguere gli antigeni self e non-self e quindi eliminare gli antigeni estranei, per proteggere l'organismo da infezioni, tumori e così via.
In condizioni normali, un segnale di "allarme" genera varie risposte cellulari che mirano a prevenire un'eccessiva risposta infiammatoria e a ripristinare l'omeostasi immunitaria. Diverse evidenze hanno dimostrato che ADO si comporta come il segnale di "allarme" in vivo. L'adenosina attiva i recettori ADO sulle cellule bersaglio, generano più risposte cellulari e quindi sopprime la risposta immunitaria. (191)
È stato dimostrato che l'ADO prodotto localmente può stimolare il rilascio di citochine antinfiammatorie (cioè, IL-10) e inibire il rilascio di molecole proinfiammatorie (cioè TNF-α e ossido nitrico) in modelli animali di infiammazione. (192)
In effetti, diversi studi suggeriscono che l'insorgenza delle malattie autoimmuni è correlata, almeno in parte, ad a perdita parziale o completa della funzione dei percorsi adenosinergici e ad una produzione locale difettosa di ADO.
Evidenze accumulate negli ultimi anni supportano l'esistenza di un legame tra la produzione di ADO e l'esito clinico di pazienti con sclerosi multipla (SM). Airas et al hanno dimostrato il trattamento con IFN-β induce l'espressione superficiale del CD73

nelle cellule endoteliali in vitro. Lo stesso effetto è stato anche osservato sulle cellule endoteliali dopo trattamento sistemico di pazienti con SM con IFN-β in vivo.
Lo stesso gruppo di autori ha riscontrato che il trattamento con IFN-β è stato seguito da un aumento dei livelli CD73 sierico e dell'espressione di CD73 microvascolare cutaneo nella maggior parte dei pazienti con SM. Questo studio ha suggerito che ADO potrebbe contribuire agli effetti benefici dell'IFN-β osservato su pazienti con SM. (193)
Fletcher et al hanno dimostrato che l'espressione di CD39 potrebbe essere correlata alla progressione della SM. Infatti, CD39 è espresso da un sottoinsieme di linfociti T regolatori. Se da un lato entrambi i sottoinsiemi dei T regolatori, ovvero CD39+ e CD39−, sono in grado di ridurre la produzione di IFN-γ da parte delle cellule T effettrici, solo le Treg CD39+ sono in grado di sopprimere la produzione di IL-17 da parte delle cellule Th17. (194)
Diversi autori hanno dimostrato il ruolo di ADO e degli ectoenzimi adenosinergici nel contesto dell'artrite reumatoide (AR).
Uno studio preclinico si è concentrato sull'analisi della suscettibilità dei topi CD73 - / - alla *collagen-induced arthritis* (CIA). I topi con deficit di CD73 sembrano significativamente più suscettibili a sviluppare CIA rispetto ai topi wild-type. Inoltre, la produzione di citochine proinfiammatore nelle articolazioni, le risposte delle cellule T Th1, e la distruzione congiunta erano tutte aumentate nei topi knock-out.
Infine, è stato rilevato un ritardo nella risposta delle IgG anti-collagene nei topi CD73-deficienti, suggerendo così un difetto nello switch isotipico.
Gli autori hanno dimostrato che l'espressione di CD73 sulle cellule non ematopoietiche era un fattore protettivo per lo sviluppo della CIA. (195)
Il ruolo chiave dei T regolatori CD39+ come immunomodulatori nel contesto dell'AR è stato dimostrato da Peres et al, che hanno analizzato la frequenza di questo sottoinsieme di cellule nel sangue periferico dei pazienti con AR trattati per tre mesi con MTX. Gli Autori hanno dimostrato che tale frequenza era aumentata nei pazienti con AR che rispondevano al MTX, ma non nei pazienti che non rispondevano, rispetto ai controlli sani. Inoltre, hanno dimostrato che i linfociti T regolatori dei pazienti che non rispondevano esprimono livelli più bassi di CD39, producono meno quantità di ADO (a partire da ATP) e mostrano una diminuzione dell'attività regolatoria, rispetto ai T regolatori dei pazienti che rispondono a MTX.
In uno studio prospettico, hanno inoltre dimostrato che i pazienti che non rispondevano mostravano un valore inferiore di espressione di CD39 sui T regolatori rispetto ai

pazienti responsivi ed ai controlli sani.
Inoltre, il blocco di CD39 ha attenuato l'effetto antiartritico del trattamento MTX in un modello murino di AR, suggerendo così che la produzione di CD39 e ADO sia coinvolta nel meccanismo d'azione di MTX e sia necessario per la reattività al trattamento.
Gli autori hanno concluso che la bassa espressione di CD39 sui T regolatori potrebbe rappresentare un biomarcatore per l'identificazione dei pazienti con AR resistente al MTX. (196)
Una alterata funzione degli ectoenzimi adenosinergici è stata inoltre osservata nel contesto dell'artrite idiopatica giovanile (AIG), una forma pediatrica di AR.
In particolare, l'espressione e la funzione di CD38 e CD73 erano ridotti nelle cellule CD16-CD56bright isolate dal liquido sinoviale di pazienti affetti da AIG.
Queste cellule hanno mostrato una cinetica alterata per la produzione di ADO e non sono riuscite ad inibire la proliferazione dei linfociti T CD4 + autologhi, se comparate a quelle isolati da controlli sani. (197)
Altri autori hanno dimostrato che, nei pazienti con AIG, l'espressione di CD73 sui linfociti CD19 + e CD8 + era inferiore nelle cellule isolate dal liquido sinoviale rispetto a quelle dal sangue periferico. Di conseguenza, le cellule CD8+ del liquido sinoviale hanno prodotto meno quantità di ADO rispetto alle controparti del sangue periferico.
Infine, l'espressione di CD73 nelle cellule del liquido sinoviale era inferiore nei pazienti con una forma oligoarticolare estesa rispetto a quelli con forme più lievi, suggerendo così che l'espressione di CD73 e la produzione di ADO sono correlate alla gravità della malattia, a causa di una ridotta attività antinfiammatoria. (198)
Un presunto ruolo di ADO è stato anche descritto nell'uveite autoimmune sperimentale (EAU), un modello murino di uveite autoimmune umana.
È stato dimostrato che il recupero dall'EAU è mediato dalle cellule immunosoppressive che presentano autoantigeni e producono ADO per attivare i T regolatori antigene specifici, attraverso ADORA2A. Questi T regolatori inducibili possono, a loro volta, sopprimere la malattia autoimmune tramite un meccanismo dipendente da PD-1 / PD-L1. (199)
Un possibile ruolo degli ectoenzimi adenosinergici ed ADO è stato recentemente ipotizzato anche nel diabete multiplo indotto da streptozotocina a basso dosaggio (MLDS-), un modello murino di diabete mellito di tipo 1 umano.
In particolare, gli autori hanno studiato il ruolo del CD39, utilizzando topi wild-type, topi KO per CD39 e topi con sovraespressione di CD39 che erano successivamente

sottoposti a MLDS. Hanno pertanto dimostrato che i topi KO per CD39 hanno sviluppato il diabete più rapidamente e con frequenza più alta rispetto ai topi wild type. Al contrario, la sovraespressione di CD39 ha protetto i topi dal diabete, attraverso la produzione di ADO e l'attivazione di ADORA2A e ADORA2B. (200)

Diversi studi supportano il concetto che ADO, così come per gli enzimi appartenenti alle vie adenosinergiche per la produzione di ADO, potrebbero rappresentare promettenti bersagli terapeutici per le malattie autoimmuni e infiammatorie.

Flogel et al hanno analizzato gli effetti di 2- (cicloesil metiltio) adenosina 5′-monofosfato (chet-AMP), un agonista (profarmaco) fosforilato di ADORA2A che richiede l'azione di CD73 per essere attivato, nei topi con CIA. La somministrazione di chet-AMP innesca attività immunosoppressive ed attività antinfiammatorie, attraverso una conversione CD73-mediata di chet-AMP in chet-ADO funzionale. Questi risultati suggeriscono che gli agonisti di ADOR possono rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico per pazienti con AR. (201)

Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando agonisti di ADORA3: il meccanismo alla base di questo effetto antinfiammatorio benefico era correlato alla soppressione della produzione di TNF-α. (202) (203)

Ingwersen et al hanno descritto un doppio ruolo per ADORA2a nel contesto della EAE (encefalomielite autoimmune sperimentale, un modello animale per la sclerosi multipla). Infatti, il trattamento preventivo con l'agonista specifico di ADORA2a ha migliorato la malattia, mentre il trattamento con lo stesso agonista dopo l'insorgenza della malattia ha peggiorato la progressione della malattia e la distruzione dei tessuti.

Questi dati hanno suggerito che ADORA2a fornisce effetti anti-infiammatori sui linfociti T e protezione nelle fasi iniziali, mentre in quelle successive l'attivazione di questo recettore può sostenere i danni ai tessuti all'interno del SNC infiammato. (204)

Tsutsui et al hanno dimostrato che il trattamento dei topi EAE con caffeina ha aumentato l'espressione di ADORA1 sulla microglia, con una conseguente riduzione della gravità dell'EAE. Tale effetto è stato ulteriormente potenziato da un trattamento concomitante con un agonista di ADORA1, suggerendo così che ADORA1 rappresenta un target terapeutico per modulare la neuroinfiammazione nella SM e nelle altre malattie demielinizzanti. (205)

Nei topi diabetici, un agonista non selettivo del recettore dell'ADO ha impedito lo sviluppo del diabete nei topi trattati con MLDS o ciclofosfamide.

C'è stata una regressione di tale effetto utilizzando antagonisti per ADORA2b ma non

per ADORA1 o per ADORA2a, suggerendo quindi che solo ADORA2b rappresenta un promettente target terapeutico per il diabete di tipo 1. (206)
Nei topi con EAU, il trattamento con CF-101, un agonista di ADORA3, ha migliorato la manifestazione patologica della malattia, attraverso l'inibizione della proliferazione dei linfociti T autoreattivi e l'inibizione del rilascio di citochine proinfiammatorie. Questo studio ha indicato un ruolo per ADORA3 come target terapeutico per l'uveite umana. (207)
Al contrario, l'attivazione di ADORA2b utilizzando un agonista specifico ha potenziato lo sviluppo della malattia nello stesso modello preclinico, attraverso l'attivazione della risposta Th-17 mediata dalle cellule dendritiche. (208)
Diversi sono gli studi clinici in corso volti a valutare il ruolo di ADO, dei suoi recettori e delle altre molecole correlate in pazienti con malattie autoimmuni / malattie infiammatorie.
CF-101 è stato testato in studi sull'uomo di fase I, IIa e fase IIb. Il trattamento è apparso sicuro e ben tollerato e induceva un effetto antinfiammatorio ed antireumatico nei pazienti con AR.
Inoltre, una correlazione significativa tra i livelli di espressione di ADORA3 e la risposta al farmaco sono stati riportati, suggerendo così che ADORA3 può rappresentare un marker biologico per prevedere la risposta al farmaco nei pazienti. (203) (209) (210)

2.4 CD38: UN POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO NELLA SCLEROSI SISTEMICA?

È ormai noto che le malattie autoimmuni, come la sclerosi sistemica (SSc), il lupus eritematoso sistemico (LES) e l'artrite reumatoide (AR) sono multifattoriali e coinvolgono l'interazione tra fattori genetici, fattori ambientali, cellule immunitarie e cellule stromali. (211) (212)
Tuttavia, i meccanismi precisi alla base della fisiopatologia di queste malattie non sono stati completamente chiariti.
Un aspetto che tradizionalmente non è stato considerato nella patogenesi di queste malattie è il potenziale ruolo del metabolismo energetico. Tuttavia, la ricerca sui processi molecolari che sottostanno alle malattie reumatiche ed immuno-mediate negli ultimi anni è aumentata ed ha sottolineato l'importanza degli intermedi del metabolismo

nella fibrosi, nella funzione immunitaria e nella modulazione del sistema immunitario. Diversi studi recenti suggeriscono ad esempio che la disregolazione del metabolismo di ossido-riduzione del nucleotide NAD+ possa svolgere un ruolo chiave nella fisiopatologia del declino della salute correlato all'età e in diverse patologie, tra cui SSc e LES. (213) (214) (215) (216) (217)

Comprendere i meccanismi precisi che portano ad una disregolazione del metabolismo del NAD+ può contribuire pertanto allo sviluppo di terapia con NAD+ come target per la fibrosi e l'autoimmunità.

Dati emergenti suggeriscono la possibilità che il CD38 possa avere un ruolo importante nella patogenesi di SSc, LES e AR, e quindi terapie mirate al CD38 potrebbero rappresentare un nuovo approccio efficace. (215) (216) (218) (219)

Si è visto ad esempio che i livelli di NAD+ intracellulare diminuiscono nei tessuti durante il processo di invecchiamento e in diversi stati di malattia acuti e cronici. (213) (214) (215) (216) Inoltre, dati recenti, sia in modelli animali che in studi umani, estendono il ruolo della riduzione di NAD+ al danno renale acuto, alle malformazioni fetali, alle miopatie mitocondriali ed alle malattie reumatiche, come SSc e LES. (268) (215) (216) (218) (219) (221) (222) (223) (224)

Infine, grazie a diversi studi, sia in modelli animali che condotti sull’uomo, è stato proposto che le terapie che mirano ad aumentare i livelli cellulari di NAD+ in vivo (cosiddette terapie di potenziamento del NAD+) potrebbero avere effetti benefici in queste malattie. (220) (223) (225) (226)

Come abbiamo visto, il processo fisiopatologico principalmente responsabile delle manifestazioni della SSc è la fibrosi tissutale.

La fibrosi è un processo di riparazione disregolato e prolungato in cui si ha un'eccessiva deposizione di componenti della matrice extracellulare (ECM), tra cui il collagene è il predominante. (211) (227) La fibrosi incontrollata, a causa della persistente attivazione dei miofibroblasti, porta alla distruzione dell'architettura dei tessuti ed infine all’insufficienza d'organo. (211) (228). La fibrosi multiorgano sincrona è una caratteristica unica e distintiva della SSc e giustifica la morbilità e mortalità di questa malattia. (211) (227)

Il persistente accumulo di miofibroblasti attivati è una caratteristica distintiva di qualsiasi tipo di fibrosi. (229) (230) I meccanismi che portano alla fibrosi e alla disfunzione dei tessuti nella SSc sono molto complessi e non del tutto compresi. (231)

Di recente, è stato suggerito che la diminuzione della funzione delle deacetilasi SIRT1 e SIRT3 dipendenti da NAD+ potrebbero svolgere un ruolo patogenetico nella SSc attraverso la perdita della loro funzione repressiva che regola la via pro-fibrotica di TGF-beta via SMAD. (232) Inoltre, è stato proposto che la perdita dell'attività di SIRT1 nei pazienti con SSc è mediata dallo stato carenziale di NAD+ causato da una maggiore espressione dell'enzima CD38 (che è NAD+ catabolico) nei loro tessuti.
Infatti, dall'analisi del trascrittoma di 68 pazienti con SSc e 22 controlli sani è emerso un aumento dell'espressione dell'mRNA di CD38 nei pazienti con SSc cutanea diffusa rispetto sia ai controlli sani sia ai pazienti con SSc cutanea limitata. Inoltre, cosa ancora più importante, l'espressione dell'mRNA di CD38 era positivamente correlata con entrambi i marcatori molecolari di fibrosi e con il Rodnan skin score modificato (mRSS). (215)
Nei modelli preclinici di SSc, il potenziamento dei livelli di NAD+ mediante somministrazione di un inibitore di CD38 o mediante l'integrazione con il derivato della vitamina B3, induceva un miglioramento sia della fibrosi cutanea che polmonare.
Il ruolo patogenetico di CD38 nella fibrosi sistemica è stato ulteriormente suggerito dalla delezione genetica di CD38. I topi knockout per CD38 sono protetti contro la fibrosi polmonare e cutanea indotta dalla bleomicina se paragonati agli animali wild-type. L'inibizione di CD38 ha prevenuto la stimolazione della sintesi di ECM indotta da TGF-b. (215)
Un altro enzima coinvolto nel catabolismo di NAD+ è NNMT. Anche NNMT è altamente espresso in biopsie cutanee di pazienti con SSc, e può svolgere un ruolo nei meccanismi cellulari di questa malattia. (233) Tuttavia, il ruolo patogeno di NNMT non è stato ancora esplorato né nei modelli animali né nei pazienti con SSc.
Le evidenze fin qui disponibili suggeriscono pertanto che terapie mirate a CD38 o che utilizzano un approccio di potenziamento del NAD+ potrebbero migliorare la fibrosi nella SSc e diminuire la suscettibilità alle infezioni nei pazienti con LES. (215) (216)
Non è tuttavia ancora chiaro se il miglior approccio contro il CD38 possa essere l'utilizzo di un anticorpo monoclonale citotossico oppure un inibitore enzimatico reversibile. Ulteriori studi sono pertanto necessari per convalidare il ruolo e la specificità cellulare di CD38 nella fisiopatologia di queste malattie, e per studiare il ruolo della terapia mirata contro CD38.
Recentemente, il daratumumab è stato usato per trattare due pazienti con LES refrattari a diverse linee terapeutiche. Dal momento che le plasmacellule cosiddette *long-lived*

sono implicate nella patogenesi del LES perché secernono autoanticorpi, ma non rispondono all'immunosoppressione standard, gli Autori hanno ipotizzato che l'uso di daratumumab potesse essere efficace in quanto il CD38 è espresso da queste cellule ad elevati livelli.

Nei due pazienti trattati, daratumumab ha indotto sostanziali benefici clinici, sostenuti dalla terapia di mantenimento con belimumab. Sono stati inoltre osservati una significativa deplezione delle plasmacellule *long-lived*, la riduzione dell'attività dell'interferone di tipo I e la down-regolazione dei trascritti delle cellule T associati all'infiammazione cronica. (234)

3. SCOPO DELLA TESI

La sclerosi sistemica, o sclerodermia (SSc), è una malattia autoimmune ad eziologia sconosciuta caratterizzata da vasculopatia e fibrosi di cute ed organi interni, in particolare polmoni, tratto gastrointestinale e cuore (9).

La SSc è una malattia severa, causa di disabilità con morbidità e mortalità direttamente collegate all'estensione della fibrosi. Nonostante gli sforzi, ad oggi non esiste una terapia curativa per la SSc, ovvero una terapia in grado di prevenire la progressione del danno d'organo (83). Per questo motivo, è assolutamente necessario indagare i meccanismi eziopatogenetici al fine di individuare target molecolari coinvolti nelle fasi precoci di malattia.

Il sistema immunitario ha un ruolo di primo piano nella patogenesi della SSc. In particolare, l'immunità adattativa, caratterizzata dallo sviluppo di linfociti B e T specifici per l'antigene, è implicata nella produzione di autoanticorpi, che hanno come bersaglio diversi autoantigeni cellulari, alcuni dei quali possono svolgere un ruolo patogenetico, come il recettore del PDGF (PDGFR). Autoanticorpi stimolanti il recettore del PDGF sono stati descritti nel siero di pazienti con SSc (235).

Come è noto, gli anticorpi vengono prodotti dalle plasmacellule (PC). Elevati livelli circolanti di PC sono stati descritti in diversi lavori nei pazienti con SSc. Ad esempio, una elevata signature plasmacellulare in biopsie cutanee provenienti da pazienti con SSc è in grado di predire la risposta al trattamento con anti-CD19 (236). Tali PC esprimono elevati livelli di marcatori cellulari, in particolare il CD27 e il CD38.

Come abbiamo visto, il CD38 è un ectoenzima multifunzionale in grado di esplicare diverse attività recettoriali, in particolare inducendo attivazione e sintesi di citochine infiammatorie e regolatorie in linfociti T e B, monociti e cellule NK, ed è espresso ad alti livelli nelle PC, in particolare nelle cellule del mieloma multiplo (237)

Daratumumab e isatuximab sono anticorpi monoclonali che hanno come target il CD38. Sono attualmente utilizzati nella terapia del mieloma multiplo, dove inducono una deplezione di cellule esprimenti alti livelli di CD38, tra cui le PC (179).

La terapia con anti-CD38, quindi, potrebbe essere curativa in una malattia come la SSc in cui il ruolo delle PC è così prominente, in particolare nelle fasi precoci di malattia, caratterizzate da una elevata produzione di autoanticorpi patogenetici.

In previsione di uno studio che possa valutare l'efficacia degli anti-CD38 nei pazienti con SSc, abbiamo voluto esaminare l'espressione di CD38 su cellule mononucleate del

sangue periferico (PBMCs), includendo linfociti B, T, cellule B e T regolatrici e cellule NK, in una coorte di pazienti con SSc.

4. PAZIENTI E METODI

4.1 Pazienti

Sono stati arruolati 28 pazienti consecutivi con SSc e 20 controlli sani. Campioni di sangue e plasma sono stati ottenuti da ogni paziente previo consenso informato.
Per ogni paziente sono stati raccolti dati clinico-demografici inclusi: sesso, età, durata e localizzazioni di malattia, subset di malattia (variante cutanea limitata o diffusa), specificità anticorpali, score cutaneo modificato di Rodnan (mRSS), terapia pregressa e terapia in atto (vedi Tabella 2).

4.2 Raccolta campioni e citofluorimetria su PBMCs

Per ogni paziente sono stati raccolti 5 ml di sangue periferico, previo consenso informato.
L'espressione dei seguenti marcatori è stata valutata sulle PBMC tramite citometria a flusso: CD38, CD39, CD73, CD3, CD4, CD25, CD203a, CD138, CD56, CD24, CD127.
Le popolazioni cellulari sono state così caratterizzate:

- linfociti T totali (CD3+)
- linfociti T helper (CD3+ CD4+)
- linfociti T citotossici (CD3+ CD8+)
- linfociti NKT (CD3+ CD56+)
- linfociti NK (CD3- CD56+)
- linfociti B totali (CD19+ CD20+)
- linfociti T regolatori (CD3+ CD4+ CD25+ FOXP3+)
- linfociti B regolatori (CD19+ CD24hi CD19+ CD38hi)
- linfociti B10 (CD19+ CD24hi CD38hi CD27+)
- linfociti GrB (CD24+ CD19+ CD38+ CD27+)
- linfociti Br1 (CD19+ CD24+ CD38+ CD27+ CD71hi)
- plasmacellule (CD38hi)
- plasmablasti (CD38hi CD27+)

La gating strategy usata per l'identificazione delle popolazioni è mostrata in Figura 6.

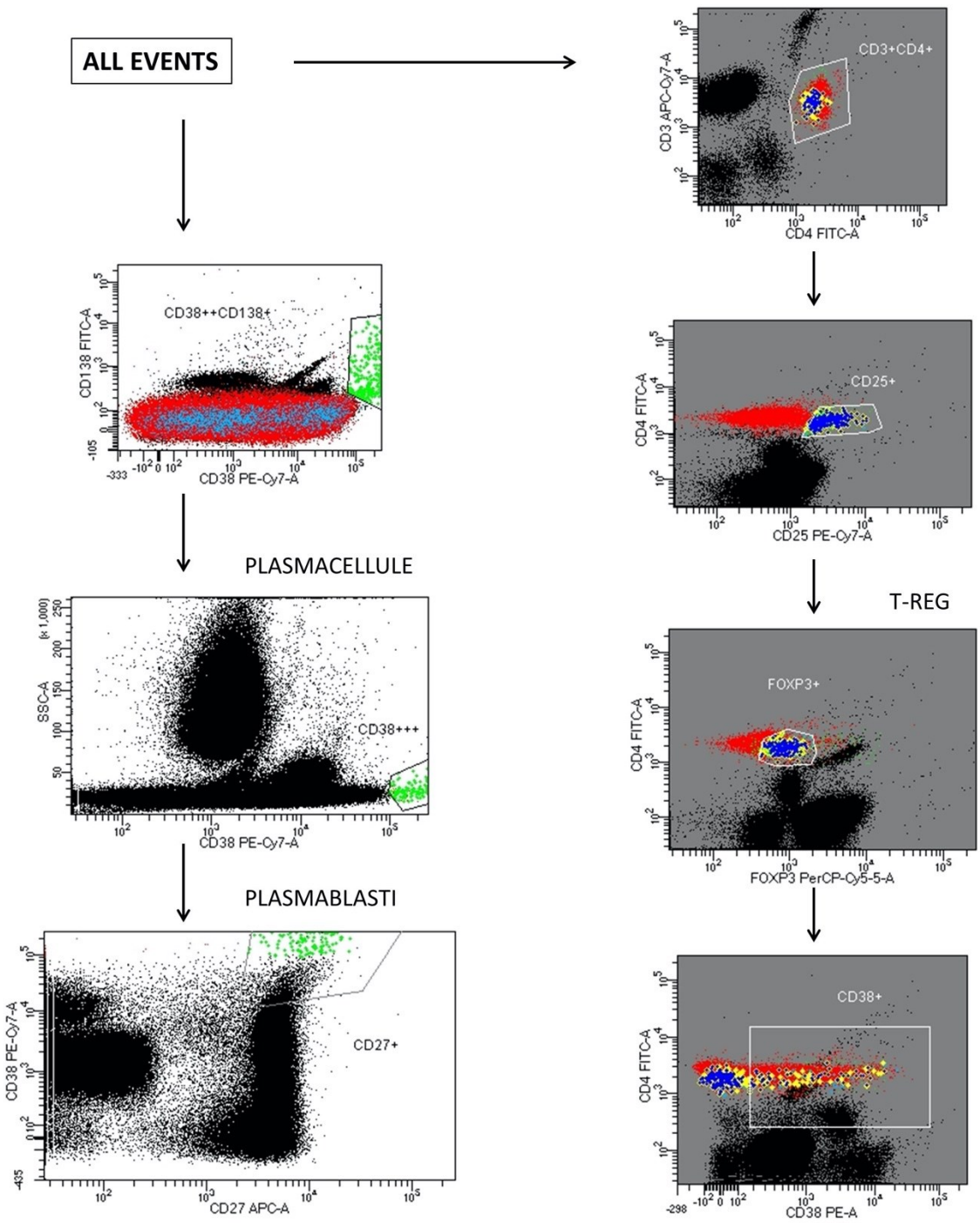


Figura 6. *Gating strategy delle sottopopolazioni linfocitarie.*

4.3 Analisi statistica

I dati delle cartelle dei pazienti sono stati trasferiti in un database elettronico reso anonimo, previo consenso informato, per l'analisi statistica.

Per testare la normalità dei set dei dati sono stati utilizzati i test omnibus di D'Agostino e Pearson.

Le variabili continue sono state riassunte come mediana e range interquartile. Le variabili categoriche sono state presentate con frequenze e percentuali assolute.
Per le variabili continue le differenze tra il gruppo dei pazienti con SSc e i controlli sani (HC) sono state confrontate usando il test di Mann-Whitney per dati indipendenti.
La significatività statistica è stata posta ad un livello di $p < 0.05$.

5. RISULTATI

5.1 Caratteristiche dei pazienti

Complessivamente sono stati arruolati 28 pazienti con SSc (23 F, età mediana 53.5 anni), di cui 18 con malattia cutanea limitata e 10 con malattia cutanea diffusa, con un mRSS mediano di 6 e una durata mediana di malattia di 4 anni. La maggior parte dei pazienti era anti-Scl70 positiva, e aveva un coinvolgimento cutaneo e polmonare. Quasi il 70% dei pazienti non aveva mai eseguito terapia immunosoppressiva prima dello studio, mentre al momento del prelievo il 25% dei pazienti era in trattamento con micofenolato mofetile.

Tabella 2. *Caratteristiche clinico-demografiche dei pazienti arruolati al baseline*

CARATTERISTICHE	N=28
Sesso	23 F (82.1%) 5 M (17.9%)
Età	53.5 (45-65.5)
Subset di malattia	10 dcSSc (35.7%) 18 lcSSc (64.3%)
Durata di malattia	4 (2-10)
Autoanticorpi	ANA = 6 (21.4%) Scl70 = 15 (53.6%) ACA = 7 (25%)
mRSS	6 (2.5-10.75)
Localizzazioni	Cutanea = 25 (89.3%) Polmonare = 22 (78.6%) Esofagea = 17 (60.7%) PAH = 2 (7.1%)

Terapia pregressa	RTX = 4 (14.3%) MMF = 3 (10.7%) CYC = 3 (10.7%) Imatinib = 1 (3.6%) Nessuna = 19 (67.9%)
Terapia in atto	MMF = 7 (25%) Steroidi = 2 (7.1%) Nessuna = 19 (67.9%)

I dati sono mostrati come mediana (range interquartile) o numero (%). Abbreviazioni: mRSS: score cutaneo di Rodnan modificato; dcSSc; diffuse cutaneous systemic sclerosis; lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis; PAH, ipertensione arteriosa polmonare; RTX, rituximab; MMF, micofenolato mofetile; CYC, ciclofosfamide.

5.2 Analisi delle popolazioni linfocitarie

Rispetto ai controlli sani, i pazienti con SSc non mostrano sostanziali differenze per quanto riguarda la percentuale di linfociti totali (24.5% vs 26%) (Figura 7A), linfociti T helper (36.9% vs 35.5%) (Figura 7B), linfociti T citotossici (23.2% vs 22.6%) (Figura 7C) e cellule NK (11.4% vs 11.7%) (Figura 7D).

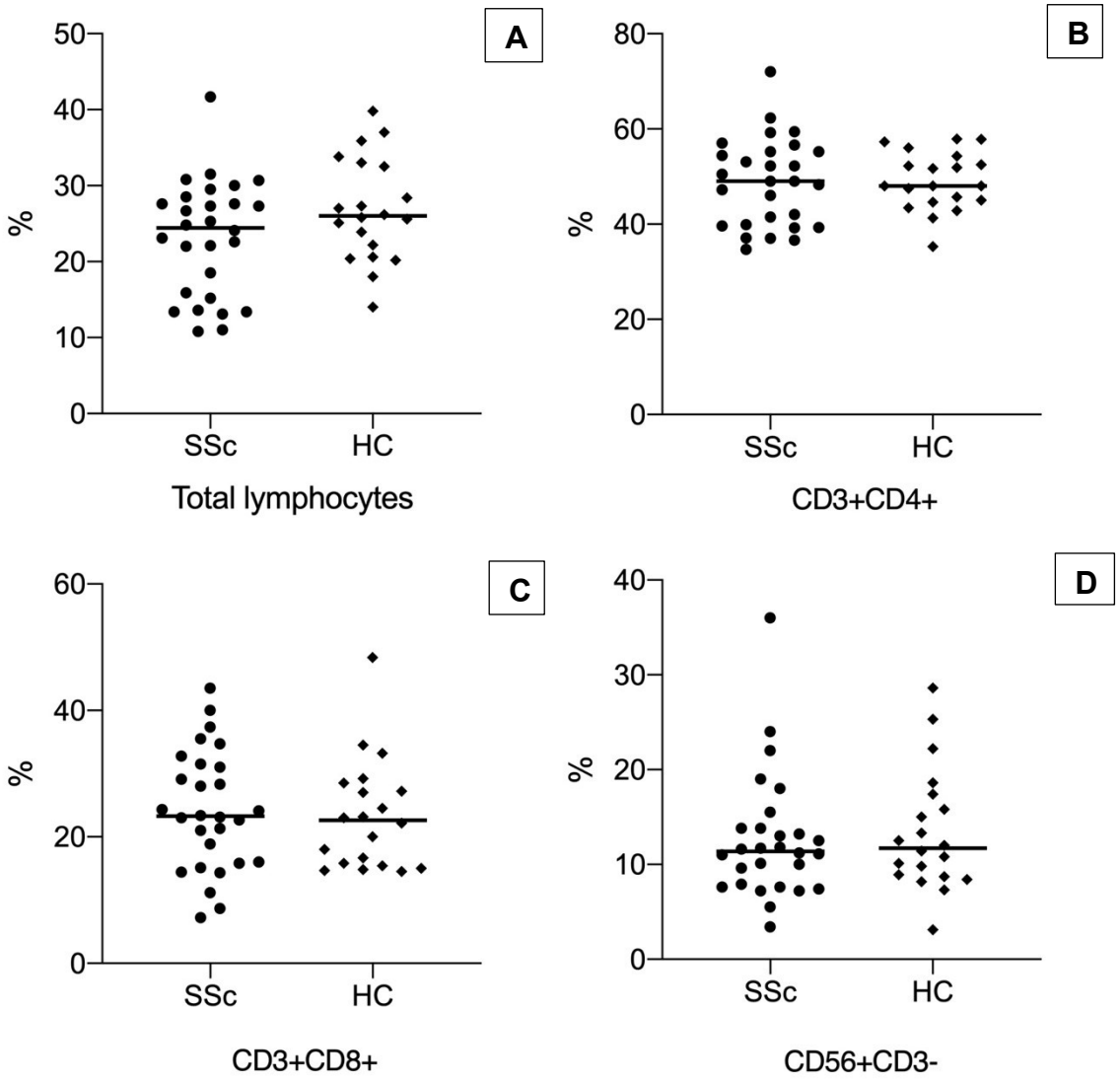


Figura 7A. *Frequenza dei linfociti totali nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*
Figura 7B. *Frequenza dei linfociti T helper nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*
Figura 7C. *Frequenza dei linfociti T citotossici nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*
Figura 7D. *Frequenza delle cellule NK nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*

Rispetto ai controlli sani, i pazienti con SSc mostrano invece una ridotta frequenza di cellule NKT (2.5% vs 5.1%, $p<0.01$) e una maggiore percentuale di linfociti B CD20+ (11.5% vs 9.2%, $p<0.01$) (Figura 8A e 8B).

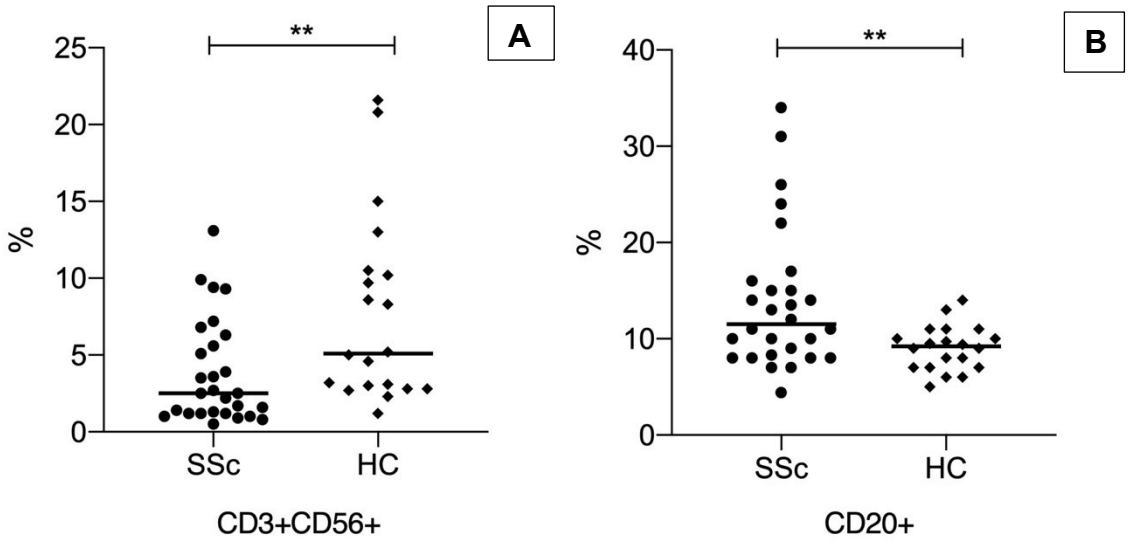


Figura 8A. *Frequenza delle cellule NKT nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).* ***Figura 8B.*** *Frequenza dei linfociti B CD20+ nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*

Tra i pazienti con SSc e i controlli sani, inoltre, non appaiono esserci differenze statisticamente significative per quanto riguarda la percentuale di cellule CD38+ all'interno delle popolazioni T e B linfocitarie totali (Figura 9A e 9B).

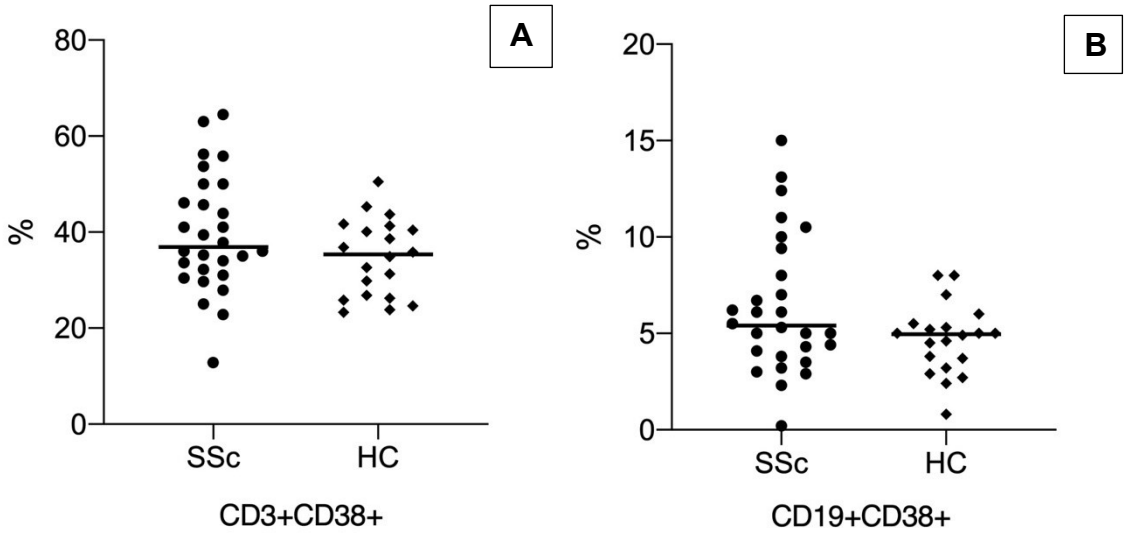


Figura 9A. *Frequenza dei linfociti T CD38+ nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).* ***Figura 9B.*** *Frequenza dei linfociti B CD38+ nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*

È interessante notare come i pazienti con SSc mostrino una ridotta frequenza di cellule T regolatorie (44.4% vs 65.5%, $p<0.01$), mentre, all'interno di queste, vi sia una più alta percentuale di cellule che esprimono il CD38 (42.9% vs 32.1%, $p<0.05$) (Figura 10A e 10B).

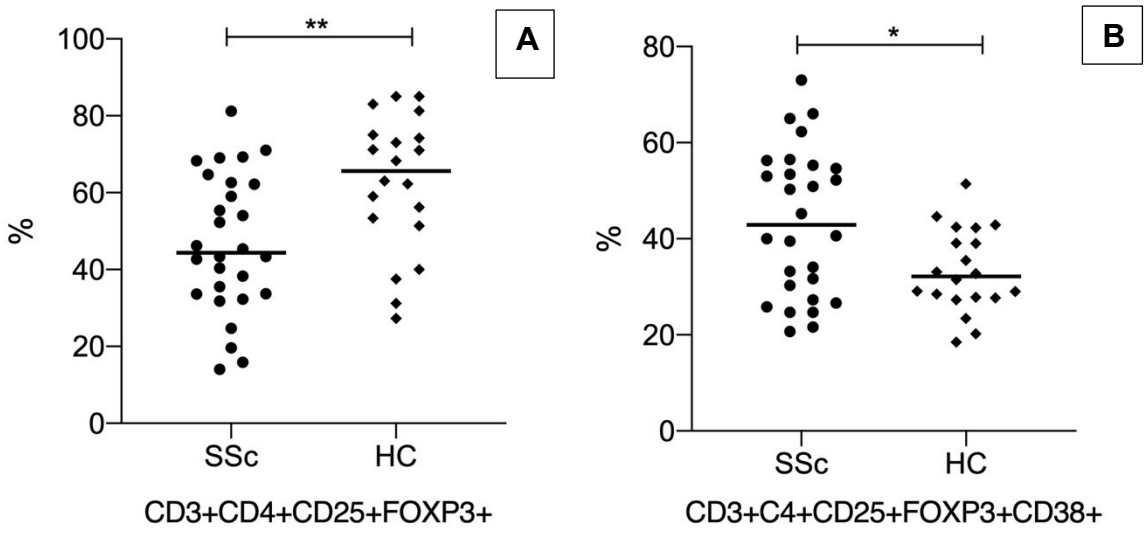
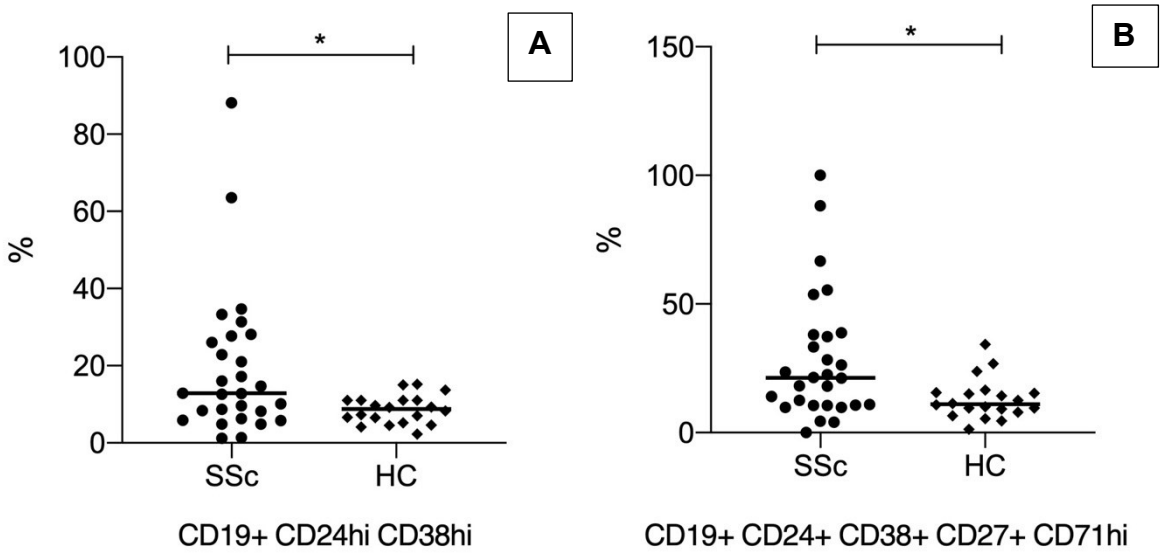


Figura 10A. *Frequenza dei linfociti T regolatori nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*
Figura 10B. *Frequenza dei linfociti T regolatori CD38+ nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*

Abbiamo inoltre studiato le sottopopolazioni delle cellule B regolatorie. Come è possibile evincere dalla Figura 11, rispetto ai controlli sani i pazienti con SSc mostrano una maggiore frequenza di B regolatori totali (12.8% vs 8.7%, p<0.05) e di linfociti Br1 (21.3% vs 11%, p<0.05), mentre è ridotta percentuale di linfociti B10 (1.9% vs 5.7%, p<0.05). Non emergono differenze significative per quanto riguarda invece i linfociti GrB (1.5% vs 3.2%, p=ns).



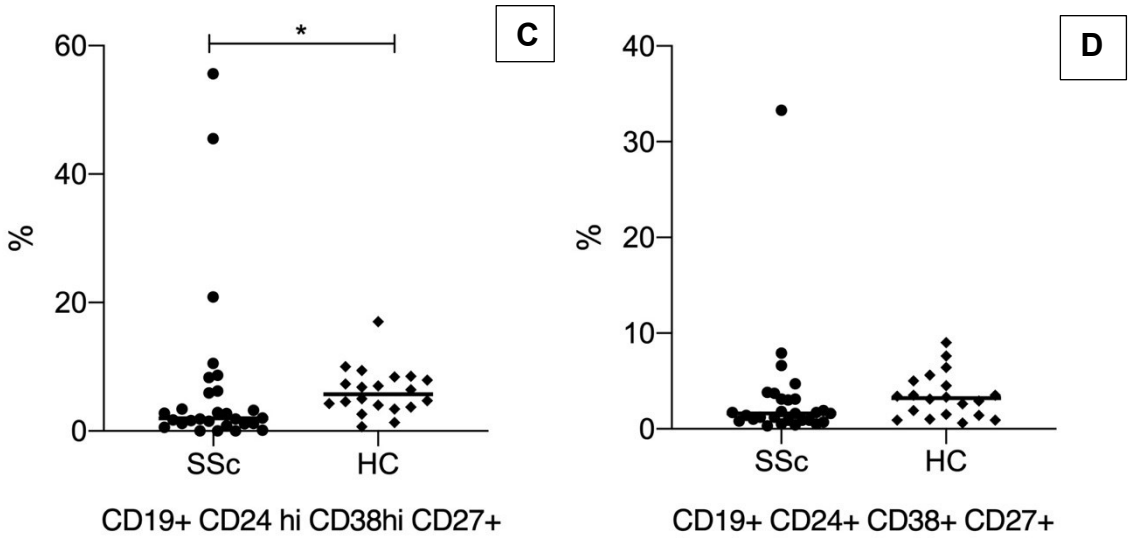


Figura 11A. *Frequenza dei linfociti B regolatori totali nei pazienti con SSc vs HC.*
Figura 11B. *Frequenza dei linfociti Br1 nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*
Figura 11C. *Frequenza dei linfociti B10 nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*
Figura 11D. *Frequenza dei linfociti GrB nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*

Infine, dalla nostra analisi emerge un significativo aumento percentuale sia dei plasmablasti (0.3% vs 0.05%, p<0.001) che delle plasmacellule circolanti (1.8% vs 0.1%, p<0.001) nei pazienti con SSc rispetto ai controlli sani (Figura 12).

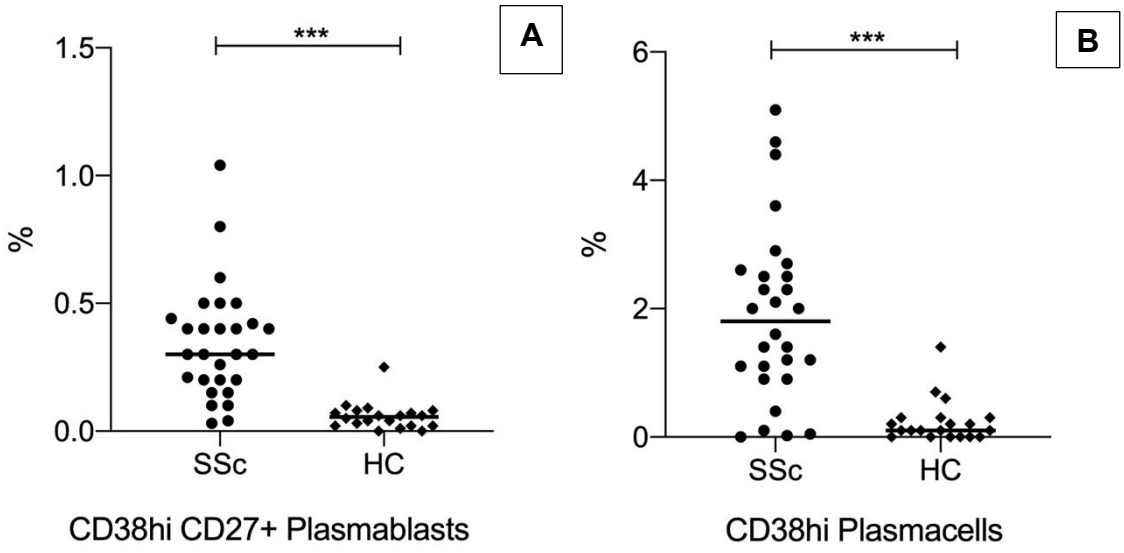


Figura 12A. *Frequenza dei plasmablasti nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*
Figura 12B. *Frequenza delle plasmacellule circolanti nei pazienti con SSc vs controlli sani (HC).*

6. DISCUSSIONE

Nel nostro lavoro abbiamo voluto caratterizzare le cellule del sistema immunitario circolanti nei pazienti affetti da sclerosi sistemica, confrontandole con un gruppo di controllo composto da soggetti sani. In particolare, abbiamo caratterizzato le sottopopolazioni delle cellule linfocitarie T, B, NK, NKT e regolatorie.

Diverse alterazioni significative all'interno del compartimento linfocitario sono state individuate nei pazienti con SSc. Il riscontro più significativo è quello di un aumento dei plasmablasti e delle plasmacellule circolanti, sottopopolazioni che esprimono elevati livelli di CD38. Questo riscontro si accompagna ad una aumentata espressione di CD38 nelle cellule regolatorie sia del compartimento B che del compartimento T, mentre per quanto riguarda l'espressione di CD38 nei linfociti T e B totali non sono state osservate differenze statisticamente significative tra la popolazione con SSc e i controlli sani. Infine, sebbene il numero dei linfociti T helper, T citotossici e cellule NK non sia differente tra le due popolazioni, nei pazienti con SSc vi è una ridotta frequenza di cellule NKT e una aumentata frequenza di cellule CD20+.

Molte delle alterazioni fenotipiche linfocitarie che abbiamo riscontrato sono già state osservate in letteratura, come ad esempio la riduzione delle cellule NKT (238).

Altri lavori hanno riscontrato una riduzione delle cellule B memoria, e un aumento dei linfociti B attivati. (239).

In uno studio recente, infine, l'aumento dei plasmablasti circolanti correlava positivamente con l'attività di malattia (238).

Nonostante vi sia evidenza di un'alterata omeostasi del compartimento B nelle PBMCs dei pazienti con SSc, il ruolo delle cellule B nella patogenesi della malattia è ancora controverso. (240) (241)

Pur essendo noto infatti che la patogenesi della SSc è legata, oltre che alla vasculopatia e alla fibrosi, alla presenza di numerose alterazioni immunologiche, tra cui diverse specificità autoanticorpali, la patogenicità di questi anticorpi è tuttora in fase di valutazione. (235)

Ad ogni modo, è innegabile che le cellule B svolgano un ruolo di primo piano, perlomeno nelle fasi iniziali di malattia, dal momento che la terapia con Rituximab (che ha come bersaglio il CD20) ha dimostrato una efficacia variabile, sebbene prevalentemente in diversi studi prevalentemente di natura osservazionale. (242) (243)

La limitata efficacia del Rituximab sembra essere in parte ascrivibile alla mancata espressione del CD20 a livello delle plasmacellule *long-lived* (244). È noto infatti che queste plasmacellule, che hanno raggiunto il più alto grado di differenziazione e producono anticorpi nella nicchia protettiva del midollo osseo, non esprimono il CD20 e sono relativamente protette dalla deplezione da parte del Rituximab. Tali plasmacellule e i loro precursori, cosiddetti plasmablasti, sono caratterizzati invece da un'intensa espressione dell'antigene di superficie CD38, che come abbiamo visto non svolge soltanto una funzione di marcatore ma bensì dei ruoli enzimatici rilevanti anche dal punto di vista metabolico. (245)

A rendere il CD38 un bersaglio promettente, oltre al fatto che vi sono già in commercio diversi farmaci approvati per l'uso clinico nei pazienti con mieloma multiplo, è proprio il caratteristico pattern di espressione a livello delle sottopopolazioni linfocitarie, ovvero la mancata espressione nei precursori e nelle cellule immature e, al contrario, l'elevata espressione nelle cellule direttamente responsabili della produzione di autoanticorpi. (219)

Per tale motivo due pazienti con una malattia autoimmunitaria quale il lupus eritematoso sistemico, refrattaria a molteplici linee di terapia, sono stati trattati con il daratumumab, con efficacia che a lungo termine è stata mantenuta dalla somministrazione di belimumab. (234)

La nostra analisi ha tuttavia evidenziato un potenziale limite all'utilizzo di tale terapia nei pazienti con SSc e, probabilmente, nei pazienti con malattie autoimmuni in generale. L'espressione del CD38 nelle cellule regolatorie sia della linea B che della linea T potrebbe portare alla distruzione di tali popolazioni, che svolgono attività immunosoppressiva. Ciononostante, il ruolo delle cellule regolatorie nelle malattie autoimmuni sistemiche non è stato ancora completamente chiarito. (246)

Inoltre, come abbiamo già visto, il CD38 sembra intervenire nella patogenesi delle malattie autoimmuni indipendentemente dalla sua espressione nelle cellule del sistema immunitario. (244) A tale proposito, quindi, non è ancora chiaro se il miglior approccio contro il CD38 possa essere l'utilizzo di un anticorpo monoclonale citotossico piuttosto che un inibitore enzimatico reversibile.

Ulteriori studi sono pertanto necessari per convalidare il ruolo e la specificità cellulare di CD38 nella fisiopatologia di queste malattie, e per studiare il ruolo della terapia mirata contro il CD38.

7. CONCLUSIONI

In questo studio preliminare, abbiamo dimostrato che i pazienti con sclerosi sistemica mostrano diverse alterazioni delle sottopopolazioni linfocitarie circolanti rispetto ai controlli sani. In particolare, nei pazienti con SSc si riscontra una più alta percentuale di plasmablasti e plasmacellule, cellule che esprimono il CD38 ad elevati livelli.
L'ectoenzima CD38, quindi, potrebbe rappresentare un nuovo potenziale target terapeutico in una condizione cronica per la quale una terapia curativa non è ancora disponibile. Ulteriori studi sono pertanto necessari per valutare il potenziale impatto delle terapie anti-CD38 nella sclerosi sistemica e nelle malattie autoimmuni in generale.

8. BIBLIOGRAFIA

(1) Denton, Christopher P, e Dinesh Khanna. (2017) «Systemic Sclerosis». *The Lancet* 390, n. 10103: 1685–99.

(2) Chifflot, Hélène, Bruno Fautrel, Christelle Sordet, Emmanuel Chatelus, e Jean Sibilia. (2008) «Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis: A Systematic Literature Review». *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 37, n. 4 : 223–35.

(3) Pope, Janet E., e Sindhu R. Johnson. (2015) «New Classification Criteria for Systemic Sclerosis (Scleroderma)». *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 41, n. 3: 383–98.

(4) Hoogen, Frank van den, Dinesh Khanna, Jaap Fransen, Sindhu R. Johnson, Murray Baron, Alan Tyndall, Marco Matucci-Cerinic, et al. (2013) «2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Collaborative Initiative». *Annals of the Rheumatic Diseases* 72, n. 11 : 1747–55.

(5) Christopher P Denton. (2019) «Overview and classification of scleroderma disorders».

(6) Kucharz, Eugeniusz, e Magdalena Kopeć-Mędrek. (2017) «Systemic Sclerosis Sine Scleroderma». *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 26, n. 5 : 875–80.

(7) Yannick Allanore, Robert Simms, Oliver Distler, Maria Trojanowska, Janet Pope, Christopher P. Denton, e John Varga. (2015) «Systemic Sclerosis». *Nature Reviews Disease Primers*, 23, 15002.

(8) Stern, Edward P., e Christopher P. Denton. (2015) «The Pathogenesis of Systemic Sclerosis». *Rheumatic Disease Clinics of North America* 41, n. 3 : 367–82.

(9) Gabrielli, Armando, Enrico V. Avvedimento, e Thomas Krieg. (2009) «Scleroderma». *New England Journal of Medicine* 360, n. 19 : 1989–2003.

(10) Trojanowska, Maria. (2010) «Cellular and Molecular Aspects of Vascular Dysfunction in Systemic Sclerosis». *Nature Reviews. Rheumatology* 6, n. 8 : 453–60.

(11) Delle Sedie, Andrea, Lucrezia Riente, Lavinia Maggiorini, Federico Pratesi, Antonio Tavoni, Paola Migliorini, e Ilaria Puxeddu. (2018) «Potential Biomarkers in Patients with Systemic Sclerosis». *International Journal of Rheumatic Diseases* 21, n. 1: 261–65.

(12) Kuryliszyn-Moskal, Anna, Piotr Adrian Klimiuk, e Stanislaw Sierakowski. (2005) «Soluble Adhesion Molecules (SVCAM-1, SE-Selectin), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Endothelin-1 in Patients with Systemic Sclerosis: Relationship to Organ Systemic Involvement». *Clinical Rheumatology* 24, n. 2 : 111–16.

(13) Thuan, Duong Thi Bich, Hatem Zayed, Ali H. Eid, Haissam Abou-Saleh, Gheyath K. Nasrallah, Arduino A. Mangoni, e Gianfranco Pintus. (2018) «A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis». *Frontiers in Immunology* 9 .

(14) Casciola-Rosen, Livia, Fredrick Wigley, e Antony Rosen. (1997) «Scleroderma Autoantigens Are Uniquely Fragmented by Metal-Catalyzed Oxidation Reactions: Implications for Pathogenesis». *The Journal of Experimental Medicine* 185, n. 1 : 71.

(15) Svegliati, Silvia, Tatiana Spadoni, Gianluca Moroncini, e Armando Gabrielli. (2018) «NADPH oxidase, oxidative stress and fibrosis in systemic sclerosis». *Free Radical Biology and Medicine*, Oxidative stress and altered redox signalling in autoimmune and connective tissue diseases, 125 : 90–97.

(16) Cutolo, Maurizio, Stefano Soldano, e Vanessa Smith. (2019) «Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights». *Expert Review of Clinical Immunology* 15, n. 7 : 753–64.

(17) Gabrielli, A., M. Montroni, S. Rupoli, M. L. Caniglia, F. DeLustro, e G. Danieli.

(1988) «A Retrospective Study of Antibodies against Basement Membrane Antigens (Type IV Collagen and Laminin) in Patients with Primary and Secondary Raynaud's Phenomenon.» *Arthritis and Rheumatism* 31, n. 11 : 1432–36.

(18) Assassi, Shervin, Maureen D. Mayes, Frank C. Arnett, Pravitt Gourh, Sandeep K. Agarwal, Terry A. McNearney, Damien Chaussabel, et al. (2010) «Systemic Sclerosis and Lupus: Points in an Interferon-Mediated Continuum». *Arthritis and Rheumatism* 62, n. 2 : 589–98.

(19) Raja, Jasmin, e Christopher Paul Denton. (2015) «Cytokines in the Immunopathology of Systemic Sclerosis». *Seminars in Immunopathology* 37, n. 5 : 543–57.

(20) Zacay, Galia, e Yair Levy. (2018) «Outcomes of patients with systemic sclerosis treated with tocilizumab: Case series and review of the literature». *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, The forefront of autoimmunity, 32, n. 4 : 563–71.

(21) Kayser, Cristiane, e Marvin J. Fritzler. (2015) «Autoantibodies in Systemic Sclerosis: Unanswered Questions». *Frontiers in Immunology* 6.

(22) Ahmed, Sakir, Durga Prasanna Misra, e Vikas Agarwal. (2019) «Interleukin-17 Pathways in Systemic Sclerosis-Associated Fibrosis». *Rheumatology International* 39, n. 7 : 1135–43.

(23) Ho, Yuen Yee, David Lagares, Andrew M. Tager, e Mohit Kapoor. (2014) «Fibrosis--a Lethal Component of Systemic Sclerosis». *Nature Reviews. Rheumatology* 10, n. 7 : 390–402.

(24) Gilbane, Adrian J, Christopher P Denton, e Alan M Holmes. (2013) «Scleroderma Pathogenesis: A Pivotal Role for Fibroblasts as Effector Cells». *Arthritis Research & Therapy* 15, n. 3 : 215–215.

(25) Kalluri, Raghu. (2009) «EMT: When Epithelial Cells Decide to Become Mesenchymal-like Cells». *The Journal of Clinical Investigation* 119, n. 6 : 1417–19.

(26) Varga, J., e B. Pasche. (2009) «Transforming Growth Factor Beta as a Therapeutic Target in Systemic Sclerosis.» *Nature Reviews. Rheumatology* 5, n. 4 : 200–206.

(27) Zhao, W., Yue, X., Liu, K., Zheng, J., Huang, R., Zou, J., Yu, X. (2017). «The status of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis is associated with IRF5, STAT4, IRAK1, and CTGF polymorphisms». *Rheumatology International,* 37(8), 1303–1310.

(28) Soukup T, Veleta T. (2018). «Systemic sclerosis in 2017». *Vnitr Lek. Spring*;64(2):146-154.

(29) Michael Hughes, Amir Snapir, Jack Wilkinson, Daniel Snapir, Fredrick M., Wigley Ariane, L. Herrick (2015). «Prediction and impact of attacks of Raynaud's phenomenon, as judged by patient perception». *Rheumatology*, Volume 54, Issue 8.

(30) Hughes, M., & Herrick, A. L. (2016). «Raynaud's phenomenon». *Best Practice & Research Clinical Rheumatology,* 30(1), 112–132.

(31) Herrick, A. L. (2005). «Pathogenesis of Raynaud's phenomenon». *Rheumatology,* 44(5), 587–596.

(32) O'Connor, C. M. (2001). «Raynaud's phenomenon». *Journal of Vascular Nursing,* 19(3), 87–93.

(33) Wigley, Fredrick M., e Nicholas A. Flavahan. (2016) «Raynaud's Phenomenon». A cura di Edward W. Campion. *New England Journal of Medicine* 375, n. 6 : 556–65.

(34) Sunderkotter, C. (2006). «Pathophysiology and clinical consequences of Raynaud's phenomenon related to systemic sclerosis». *Rheumatology,* 45(Supplement 3), iii33–iii35.

(35) Czirjak, L., Foeldvari, I., & Muller-Ladner, U. (2008). «Skin involvement in systemic sclerosis». *Rheumatology,* 47(Supplement 5), v44–v45.

(36) Clements, P. J. (2000). «Systemic sclerosis (scleroderma) and related disorders: clinical aspects». *Best Practice & Research Clinical Rheumatology,* 14(1), 1–16.

(37) Caterina Ferreli, Giulia Gasparini, Aurora Parodi, Emanuele Cozzani, Franco Rongioletti, Laura Atzori (2017) «Cutaneous Manifestations of Scleroderma and Scleroderma-Like Disorders: a Comprehensive Review». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology,* 53(3), 306–336.

(38) Salem B, Rim BH, Sihem BK, Maher B (2013) «Oral manifestations of systemic sclerosis». *Pan Afr Med J* 16:114

(39) Crincoli V, Fatone L, Fanelli M, Rotolo RP, Chialà A, Favia G, Lapadula G. (2016) «Orofacial manifestations and temporomandibular disorders of systemic scleroderma: an observational study». *Int J Mol Sci* 17:1189

(40) Bajraktari IH, Kryeziu A, Sherifi F, Bajraktari H, Lahu A, Bajraktari G (2015) «Oral manifestations of systemic sclerosis and correlation with anti-topoisomerase I antibodies (SCL-70)». *Med Arch* 69:153–156

(41) Ostojić, Predrag, e Nemanja Damjanov. (2006) «Different Clinical Features in Patients with Limited and Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis». *Clinical Rheumatology* 25, n. 4: 453–57.

(42) Pearson, D. R., Werth, V. P., & Pappas-Taffer, L. (2018). «Systemic sclerosis: Current concepts of skin and systemic manifestations». *Clinics in Dermatology,* 36(4), 459–474.

(43) Sakata, Komei, Yuko Kaneko, Hidekata Yasuoka, e Tsutomu Takeuchi. (2019) «Association of Radiographic Findings in Hand X-Ray with Clinical Features and Autoantibodies in Patients with Systemic Sclerosis». *Clinical Rheumatology*

(44) Siao-Pin, S., Damian, L.-O., Muntean, L. M., & Rednic, S. (2016). «Acroosteolysis in systemic sclerosis: An insight into hypoxia-related pathogenesis». *Experimental and Therapeutic Medicine,* 12(5), 3459–3463.

(45) Akbar, Lujayn, Nuralhuda Akbar, Mona Al Muhaish, Shahrazad Akbar, e Atef Kamar. (2019) «Acroosteolysis in Systemic Sclerosis». *The American Journal of the Medical Sciences* 357, n. 2.

(46) Boulman, N., Slobodin, G., Rozenbaum, M., & Rosner, I. (2005). «Calcinosis in Rheumatic Diseases». *Seminars in Arthritis and Rheumatism,* 34(6), 805–812.

(47) Pettersson, H., C. Boström, F. Bringby, R. Walle-Hansen, Lth Jacobsson, E. Svenungsson, A. Nordin, e H. Alexanderson. (2019) «Muscle Endurance, Strength, and Active Range of Motion in Patients with Different Subphenotypes in Systemic Sclerosis: A Cross-Sectional Cohort Study». *Scandinavian Journal of Rheumatology* 48, n. 2 : 141–48.

(48) McMahan, Z. H., & Hummers, L. K. (2018). «Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis». *Current Opinion in Rheumatology,* 30(6), 533–540.

(49) Frech, T. M., & Mar, D. (2018). «Gastrointestinal and Hepatic Disease in Systemic Sclerosis». *Rheumatic Disease Clinics of North America,* 44(1), 15–28.

(50) Crowell, M. D., Umar, S. B., Griffing, W. L., DiBaise, J. K., Lacy, B. E., & Vela, M. F. (2017). «Esophageal Motor Abnormalities in Patients with Scleroderma: Heterogeneity, Risk Factors, and Effects on Quality of Life». *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(2), 207–213.e1.

(51) SALLAM, H., MCNEARNEY, T. A., & CHEN, J. D. Z. (2006). «Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis (scleroderma)». *Alimentary Pharmacology and Therapeutics,* 23(6), 691–712.

(52) Marie, I., Ducrotte, P., Denis, P., Menard, J.-F., & Levesque, H. (2009). «Small intestinal bacterial overgrowth in systemic sclerosis». *Rheumatology,* 48(10), 1314–1319.

(53) Selmi, C., Generali, E., & Gershwin, M. E. (2018). «Rheumatic Manifestations in

Autoimmune Liver Disease». *Rheumatic Disease Clinics of North America,* 44(1), 65–87.

(54) Buleu, Florina, Elena Sirbu, Alexandru Caraba, e Simona Dragan. (2019) «Heart Involvement in Inflammatory Rheumatic Diseases: A Systematic Literature Review». *Medicina* 55, n. 6

(55) Steen, V. D. (2014). «Kidney involvement in systemic sclerosis». *La Presse Médicale,* 43(10), e305–e314.

(56) Bussone G, Bérezné A, Pestre V, Guillevin L, Mouthon L. (2011) «The scleroderma kidney: progress in risk factors, therapy, and prevention». *Curr Rheumatol Rep.;*13(1):37-43

(57) Burbelo, Peter D., Sarah M. Gordon, Meryl Waldman, Jess D. Edison, Dustin J. Little, Rodger S. Stitt, Wayne T. Bailey, James B. Hughes, e Stephen W. Olson. (2019) «Autoantibodies Are Present before the Clinical Diagnosis of Systemic Sclerosis». *PloS One* 14, n. 3 : e0214202.

(58) Montrief, Tim, Alex Koyfman, e Brit Long. (2019) «Scleroderma Renal Crisis: A Review for Emergency Physicians». *Internal and Emergency Medicine* 14, n. 4 : 561–70.

(59) Cottin, Vincent, e Kevin K. Brown. (2019) «Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD)». *Respiratory Research* 20, n. 1 : 13.

(60) Nihtyanova, Svetlana I., Benjamin E. Schreiber, Voon H. Ong, Daniel Rosenberg, Pia Moinzadeh, J. Gerrard Coghlan, Athol U. Wells, e Christopher P. Denton. (2014) «Prediction of Pulmonary Complications and Long-Term Survival in Systemic Sclerosis». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66, n. 6 : 1625–35.

(61) Steen, V., Domsic, R. T., Lucas, M., Fertig, N., & Medsger, T. A. (2012). «A clinical and serologic comparison of African American and Caucasian patients with systemic sclerosis». *Arthritis & Rheumatism,* 64(9), 2986–2994.

(62) Mackintosh, J. A., Stainer, A., Barnett, J. L., & Renzoni, E. A. (2019). «Systemic Sclerosis Associated Interstitial Lung Disease: A Comprehensive Overview». *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 40(02), 208–226.

(63) Desai, Sujal R., Srihari Veeraraghavan, David M. Hansell, Ageliki Nikolakopolou, Nicole S. L. Goh, Andrew G. Nicholson, Thomas V. Colby, et al. (2004) «CT Features of Lung Disease in Patients with Systemic Sclerosis: Comparison with Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Nonspecific Interstitial Pneumonia». *Radiology* 232, n. 2 : 560–67.

(64) Silver, K. C., & Silver, R. M. (2015). «Management of Systemic-Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease». *Rheumatic Disease Clinics of North America,* 41(3), 439–457.

(65) Sanchez-Roman, J., Opitz, C. F., Kowal-Bielecka, O., Garcia-Hernandez, F. J., Castillo-Palma, M. J., & Pittrow, D. (2008). «Screening for PAH in patients with systemic sclerosis: focus on Doppler echocardiography». *Rheumatology,*47 (Supplement 5), v33–v35.

(66) Shahane, A. (2013). «Pulmonary hypertension in rheumatic diseases: epidemiology and pathogenesis». *Rheumatology International,* 33(7), 1655–1667.

(67) Sweiss, Nadera J., Linda Hushaw, Thenappan Thenappan, Ray Sawaqed, Roberto F. Machado, Amit R. Patel, Mardi Gomberg-Maitland, Aliya N. Husain, e Stephen L. Archer. (2010) «Diagnosis and Management of Pulmonary Hypertension in Systemic Sclerosis». *Current Rheumatology Reports* 12, n. 1 : 8–18.

(68) Khanna, Dinesh, Daniel E Furst, Philip J Clements, Yannick Allanore, Murray Baron, Lazlo Czirjak, Oliver Distler, et al. (2017) «Standardization of the Modified Rodnan Skin Score for Use in Clinical Trials of Systemic Sclerosis». *Journal of Scleroderma and Related Disorders* 2, n. 1 : 11–18.

(69) Hoffmann-Vold, Anna-Maria, Trond M. Aaløkken, May Brit Lund, Torhild

Garen, Øyvind Midtvedt, Cathrine Brunborg, Jan Tore Gran, e Øyvind Molberg. (2015) «Predictive Value of Serial High-Resolution Computed Tomography Analyses and Concurrent Lung Function Tests in Systemic Sclerosis». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 67, n. 8 : 2205–12.

(70) Strollo, D., & Goldin, J. (2010). «Imaging Lung Disease in Systemic Sclerosis». *Current Rheumatology Reports,* 12(2), 156–161.

(71) J. Behr and D. E. Furst. (2008) «Pulmonary function tests». *Rheumatology;*47: v65–v67.

(72) GARIN, M. C., HIGHLAND, K. B., SILVETR, R. M., & STRANGE, C. (2009). «Limitations to the 6-Minute Walk Test in Interstitial Lung Disease and Pulmonary Hypertension in Scleroderma». *The Journal of Rheumatology,* 36(2), 330–336.

(73) Zumstein, C. Camargo, e C. Kayser. (2019) «Capillaroscopy Changes Are Associated with Disease Progression in Patients with Early Systemic Sclerosis: A Prospective Study.» *International Journal of Rheumatic Diseases* 22, n. 7 : 1319–26.

(74) Cutolo, Maurizio, Carmen Pizzorni, Mietta Meroni, Giuseppe Zampogna, Carmela Ferrone, Elisa Alessandri, e Alberto Sulli. «[The role of nailfold videocapillaroscopy in Raynaud's phenomenon monitoring and early diagnosis of systemic sclerosis].» *Reumatismo* 62, n. 4 (2010): 237–47.

(75) Mouthon, L. (2013). «L'atteinte de la main dans la sclérodermie systémique». *La Presse Médicale,* 42(12), 1616–1626.

(76) Elhai, Muriel, Christophe Meune, Jérôme Avouac, André Kahan, e Yannick Allanore. (2012) «Trends in Mortality in Patients with Systemic Sclerosis over 40 Years: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies». *Rheumatology (Oxford, England)* 51, n. 6: 1017–26.

(77) Rubio-Rivas, Manuel, Cristina Royo, Carmen Pilar Simeón, Xavier Corbella, e Vicent Fonollosa. (2014) «Mortality and Survival in Systemic Sclerosis: Systematic

Review and Meta-Analysis». *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 44, n. 2 : 208–19.

(78) Elhai, Muriel, Christophe Meune, Marouane Boubaya, Jérôme Avouac, Eric Hachulla, Alexandra Balbir-Gurman, Gabriela Riemekasten, et al. (2017) «Mapping and Predicting Mortality from Systemic Sclerosis». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76, n. 11: 1897–1905.

(79) Bonifazi, Martina, Irene Tramacere, Giovanni Pomponio, Barbara Gabrielli, Enrico V. Avvedimento, Carlo La Vecchia, Eva Negri, e Armando Gabrielli. (2013) «Systemic Sclerosis (Scleroderma) and Cancer Risk: Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies». *Rheumatology* 52, n. 1 : 143–54.

(80) Igusa, Takeru, Laura K. Hummers, Kala Visvanathan, Carrie Richardson, Fredrick M. Wigley, Livia Casciola-Rosen, Antony Rosen, e Ami A. Shah. (2018) «Autoantibodies and Scleroderma Phenotype Define Subgroups at High-Risk and Low-Risk for Cancer». *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, n. 8: 1179–86

(81) Fransen, J., D. Popa-Diaconu, R. Hesselstrand, P. Carreira, G. Valentini, L. Beretta, P. Airo, et al. (2011) «Clinical Prediction of 5-Year Survival in Systemic Sclerosis: Validation of a Simple Prognostic Model in EUSTAR Centres». *Annals of the Rheumatic Diseases* 70, n. 10 : 1788–92.

(82) Balbir-Gurman, Alexandra, e Yolanda Braun-Moscovici. (2012) «Scleroderma - New Aspects in Pathogenesis and Treatment». *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology* 26, n. 1: 13–24.

(83) Kowal-Bielecka, Otylia, Jaap Fransen, Jerome Avouac, Mike Becker, Agnieszka Kulak, Yannick Allanore, Oliver Distler, et al. (2017) «Update of EULAR Recommendations for the Treatment of Systemic Sclerosis». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76, n. 8 : 1327–39.

(84) Wigley, Fredrick M., e Nicholas A. Flavahan. (2016) «Raynaud's Phenomenon». *The New England Journal of Medicine* 375, n. 6 : 556–65.

(85) Montanelli, Gaia, Lorenzo Beretta, Alessandro Santaniello, e Raffaella Scorza. (2013) «Effect of Dihydropyridine Calcium Channel Blockers and Glucocorticoids on the Prevention and Development of Scleroderma Renal Crisis in an Italian Case Series». *Clinical and Experimental Rheumatology* 31, n. 2 Suppl 76 : 135–39.

(86) Thompson, A. E., B. Shea, V. Welch, D. Fenlon, e J. E. Pope. (2001) «Calcium-Channel Blockers for Raynaud's Phenomenon in Systemic Sclerosis». *Arthritis and Rheumatism* 44, n. 8 : 1841–47.

(87) Tingey, Theresa, Jenny Shu, Joseph Smuczek, e Janet Pope. (2013) «Meta-Analysis of Healing and Prevention of Digital Ulcers in Systemic Sclerosis». *Arthritis Care & Research* 65, n. 9 : 1460–71.

(88) Linnemann B, Erbe M. (2016) «Raynaud's phenomenon and digital ischaemia - pharmacologic approach and alternative treatment options». *Vasa* 45, n.3: 201-12

(89) Korn, J. H., M. Mayes, M. Matucci Cerinic, M. Rainisio, J. Pope, E. Hachulla, E. Rich, et al. (2004) «Digital Ulcers in Systemic Sclerosis: Prevention by Treatment with Bosentan, an Oral Endothelin Receptor Antagonist». *Arthritis and Rheumatism* 50, n. 12: 3985–93.

(90) Emmanuel, Anton. «Current Management of the Gastrointestinal Complications of Systemic Sclerosis». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 13, n. 8 (2016): 461–72.

(91) Donnellan, C., N. Sharma, C. Preston, e P. Moayyedi. (2005) «Medical Treatments for the Maintenance Therapy of Reflux Oesophagitis and Endoscopic Negative Reflux Disease». *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 2

(92) Hasler, William L. (2003) «Pharmacotherapy for Intestinal Motor and Sensory Disorders». *Gastroenterology Clinics of North America* 32, n. 2 : 707–32, viii–ix.

(93) Parodi, Andrea, Marta Sessarego, Alfredo Greco, Marco Bazzica, Gilberto Filaci, Maurizio Setti, Edoardo Savarino, Francesco Indiveri, Vincenzo Savarino, e

Massimo Ghio. (2008) «Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Patients Suffering from Scleroderma: Clinical Effectiveness of Its Eradication». *The American Journal of Gastroenterology* 103, n. 5 : 1257–62.

(94) Woodworth, Thasia G., Yossra A. Suliman, Wendi Li, Daniel E. Furst, e Philip Clements. (2016) «Scleroderma Renal Crisis and Renal Involvement in Systemic Sclerosis». *Nature Reviews. Nephrology* 12, n. 11 : 678–91.

(95) Penn, H., A. J. Howie, E. J. Kingdon, C. C. Bunn, R. J. Stratton, C. M. Black, A. Burns, e C. P. Denton. (2007) «Scleroderma Renal Crisis: Patient Characteristics and Long-Term Outcomes». *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians* 100, n. 8: 485–94.

(96) Gibney, Eric M., Chirag R. Parikh, Alkesh Jani, Michael J. Fischer, David Collier, e Alexander C. Wiseman. (2004) «Kidney Transplantation for Systemic Sclerosis Improves Survival and May Modulate Disease Activity». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, n. 12: 2027–31.

(97) Badesch, D. B., V. F. Tapson, M. D. McGoon, B. H. Brundage, L. J. Rubin, F. M. Wigley, S. Rich, et al. (2000) «Continuous Intravenous Epoprostenol for Pulmonary Hypertension Due to the Scleroderma Spectrum of Disease. A Randomized, Controlled Trial». *Annals of Internal Medicine* 132, n. 6 : 425–34.

(98) Raghu, Ganesh, Bram Rochwerg, Yuan Zhang, Carlos A. Cuello Garcia, Arata Azuma, Juergen Behr, Jan L. Brozek, et al. (2015) «An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192, n. 2 : e3-19.

(99) Jee, Adelle S., e Tamera J. Corte. (2019) «Current and Emerging Drug Therapies for Connective Tissue Disease-Interstitial Lung Disease (CTD-ILD)». *Drugs*

(100) Lee, Joyce S., e Aryeh Fischer. (2016) «Current and Emerging Treatment Options for Interstitial Lung Disease in Patients with Rheumatic Disease». *Expert Review of Clinical Immunology* 12, n. 5 : 509–20.

(101) Iudici, Michele. (2017) «What Should Clinicians Know about the Use of Glucocorticoids in Systemic Sclerosis?» *Modern Rheumatology* 27, n. 6 : 919–23.

(102) Strehl, C, C M Spies, e F Buttgereit. (2011) «Pharmacodynamics of Glucocorticoids». Clin Exp Rheumatol s.d., 6.

(103) Trang, Gerald, Russell Steele, Murray Baron, e Marie Hudson. (2012) «Corticosteroids and the Risk of Scleroderma Renal Crisis: A Systematic Review». *Rheumatology International* 32, n. 3: 645–53.

(104) Hall, A. G., e M. J. Tilby. (1992) «Mechanisms of Action of, and Modes of Resistance to, Alkylating Agents Used in the Treatment of Haematological Malignancies». *Blood Reviews* 6, n. 3: 163–73.

(105) Martinez, Fernando J., e W. Joseph McCune. (2006) «Cyclophosphamide for Scleroderma Lung Disease». *The New England Journal of Medicine* 354, n. 25: 2707–9.

(106) Allison, A. C., e E. M. Eugui. (2000) «Mycophenolate Mofetil and Its Mechanisms of Action». *Immunopharmacology* 47, n. 2–3: 85–118.

(107) Frech, Tracy M., Victoria K. Shanmugam, Ami A. Shah, Shervin Assassi, Jessica K. Gordon, Faye N. Hant, Monique E. Hinchcliff, et al. (2013) «Treatment of Early Diffuse Systemic Sclerosis Skin Disease». *Clinical and Experimental Rheumatology* 31, n. 2 Suppl 76 : 166–71.

(108) Daoussis, Dimitrios, Konstantinos Melissaropoulos, Georgios Sakellaropoulos, Ioannis Antonopoulos, Theodora E. Markatseli, Theodora Simopoulou, Panagiotis Georgiou, et al. (2017) «A Multicenter, Open-Label, Comparative Study of B-Cell Depletion Therapy with Rituximab for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease». *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 46, n. 5: 625–31.

(109) Giuggioli, Dilia, Federica Lumetti, Michele Colaci, Poupak Fallahi, Alessandro Antonelli, e Clodoveo Ferri. (2015) «Rituximab in the Treatment of Patients with Systemic Sclerosis. Our Experience and Review of the Literature». *Autoimmunity Reviews* 14, n. 11: 1072–78.

(110) Sanges, Sébastien, Sébastien Rivière, Arsène Mekinian, Thierry Martin, Alain Le Quellec, Emmanuel Chatelus, Alain Lescoat, et al. (2017) «Intravenous immunoglobulins in systemic sclerosis: Data from a French nationwide cohort of 46 patients and review of the literature». *Autoimmunity Reviews* 16, n. 4 : 377–84.

(111) Host, L, M Nikpour, A Calderone, P Cannell, e J Roddy. (2017) «Autologous Stem Cell Transplantation in Systemic Sclerosis: A Systematic Review». *Clinical and Experimental Rheumatology*, 10.

(112) Z. H. Nemeth, S. J. Leibovich, E. A. Deitch et al., “Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism,” Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 312, no. 4, pp. 883–888, 2003.

(113) V. Le Vraux, Y. L. Chen, I. Masson et al., “Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists,” Life Sciences, vol. 52, no. 24, pp. 1917–1924, 1993.

(114) L. Antonioli, P. Pacher, E. S. Vizi, and G. Hasko, “CD39 and CD73 in immunity and inflammation,” Trends in Molecular Medicine, vol. 19, no. 6, pp. 355–367, 2013.

(115) G. Fedele, I. Sanseverino, K. D'Agostino et al., “Unconventional, adenosine-producing suppressor T cells induced by dendritic cells exposed to BPZE1 pertussis vaccine,” Journal of Leukocyte Biology, vol. 98, no. 4, pp. 631–639, 2015.

(116) A. L. Horenstein, A. Chillemi, G. Zaccarello et al., “A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes,” Oncoimmunology, vol. 2, no. 9, article e26246, 2013.

(117) L. Antonioli, C. Blandizzi, P. Pacher, and G. Hasko, “Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine,” Nature Reviews Cancer, vol. 13, no. 12, pp. 842–857, 2013.

(118) J. B. Rose and I. R. Coe, “Physiology of nucleoside transporters: back to the future,” Physiology, vol. 23, pp. 41–48, 2008.

(119) G. Cristalli, S. Costanzi, C. Lambertucci et al., “Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors,” Medicinal Research Reviews, vol. 21, no. 2, pp. 105–128, 2001.

(120) W. P. Schrader, B. Pollara, and H. J. Meuwissen, “Characterization of the residual adenosine deaminating activity in the spleen of a patient with combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 75, no. 1, pp. 446–450, 1978.

(121) A. A. Welihinda, M. Kaur, K. S. Raveendran, and E. P. Amento, “Enhancement of inosine-mediated A2AR signaling through positive allosteric modulation,” Cellular Signalling, vol. 42, pp. 227–235, 2018.

(122) M. Mandapathil, B. Hilldorfer, M. J. Szczepanski et al., “Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells,” The Journal of Biological Chemistry, vol. 285, no. 10, pp. 7176–7186, 2010.

(123) F. Morandi, A. L. Horenstein, A. Chillemi et al., “CD56brightCD16- NK cells produce adenosine through a CD38-mediated pathway and act as regulatory cells inhibiting autologous CD4+ T cell proliferation,” The Journal of Immunology, vol. 195, no. 3, pp. 965–972, 2015.

(124) I. D. Mascanfroni, M. C. Takenaka, A. Yeste et al., “Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1-*α*,” Nature Medicine, vol. 21, no. 6, pp. 638–646, 2015.

(125) F. Figueiró, L. Muller, S. Funk, E. K. Jackson, A. M. Battastini, and T. L. Whiteside, “Phenotypic and functional characteristics of CD39high human regulatory B cells (Breg),” Oncoimmunology, vol. 5, no. 2, article e1082703, 2016.

(126) J. Li, L. Wang, X. Chen et al., “CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-*β*-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer,” Oncoimmunology, vol. 6, no. 6, article e1320011, 2017.

(127) V. Quarona, V. Ferri, A. Chillemi et al., “Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche,” Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1335, no. 1, pp. 10–22, 2015.

(128) E. Kerkela, A. Laitinen, J. Rabina et al., “Adenosinergic immunosuppression by human mesenchymal stromal cells requires co-operation with T cells,” Stem Cells, vol. 34, no. 3, pp. 781– 790, 2016.

(129) Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. Immunol Today 1994; 15:95-7; PMID:8172650; http://dx.doi. org/10.1016/0167-5699(94)90148-1

(130) Goding JW. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. J Leukoc Biol 2000; 67:285-311; PMID:10733089

(131) Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. Immunol Rev 1998; 161:11-26; PMID:9553761; http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01568.x

(132) Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. Immunol Rev 1998; 161:95-109; PMID:9553767; http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01574.x

(133) Sorrentino R, Pinto A, Morello S. The adenosinergic system in cancer: Key therapeutic target. Oncoimmunology 2013; 2:e22448; PMID:23483072, http://dx.doi.org/10.4161/onci.22448

(134) Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. Nat Rev Drug Discov 2008; 7:759-70; PMID:18758473; http://dx.doi.org/10.1038/nrd2638

(135) Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. Nat Rev Immunol 2011; 11:201-12; PMID:21331080; http://dx.doi.org/10.1038/nri2938

(136) Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends MolMed 2013; 19:355-67; PMID:23601906; http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005

(137) Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? Int Immunol 2009; 21:1105-11; PMID:19737784; http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxp095

(138) Jun JE, Goodnow CC. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. Nat Immunol 2003; 4:1057-64; PMID:14586424; http://dx.doi.org/10.1038/ni1001

(139) Ma Y, Adjemian S, Yang H, Catani JP, Hannani D, Martins I, Michaud M, Kepp O, Sukkurwala AQ, Vacchelli E, et al. ATP-dependent recruitment, survival and differentiation of dendritic cell precursors in the tumor bed after anticancer chemotherapy. Oncoimmunology 2013; 2:e24568; PMID:23894718; http://dx.doi.org/10.4161/onci.24568

(140) Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. Immunity 2013; 39:74-88; PMID:23890065; http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.014

(141) Palumbo A, Anderson K.Multiple myeloma. N Engl JMed. (2011) 364:1046–60. doi: 10.1056/NEJMra1011442

(142) Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. Blood. (2015) 125:3049–58. doi: 10.1182/blood-2014-11-568881

(143) Horenstein AL, Morandi F, Bracci C, Pistoia V, Malavasi F. Functional insights into nucleotide-metabolizing ectoenzymes expressed by bone marrow-resident cells in patients with multiple myeloma. Immunol Lett. (2018) 205:40–50. doi: 10.1016/j.imlet.2018.11.007

(144) Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. Cancer Metastasis Rev. (2007). 26:273–9. doi: 10.1007/s10555-007-9054-2

(145) Pezzolo A, Marimpietri D, Raffaghello L, Cocco C, Pistorio A, Gambini C, et al. Failure of anti tumor-derived endothelial cell immunotherapy depends on augmentation of tumor hypoxia. Oncotarget. (2014) 5:10368–81.doi: 10.18632/oncotarget.2015

(146) Abe M, Hiura K, Wilde J, Shioyasono A, Moriyama K, Hashimoto T, et al. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. Blood. (2004) 104:2484–91. doi: 10.1182/blood-2003-11-3839

(147) Quarona V, Ferri V, Chillemi A, Bolzoni M, Mancini C, Zaccarello G, et al. Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche. Ann N Y Acad Sci. (2015) 1335:10–22. doi: 10.1111/nyas.12485

(148) Apasov S, Koshiba M, Redegeld F, Sitkovsky MV. Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions. Immunol Rev. (1995) 146:5–19.doi: 10.1111/j.1600-065X.1995.tb00680.x

(149) Allard D, Turcotte M, Stagg J. Targeting A2 adenosine receptors in cancer. Immunol Cell Biol. (2017) 95:333–9. doi: 10.1038/icb.2017.8

(150) Sitkovsky MV, Ohta A. The ‘danger’ sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? Trends Immunol. (2005) 26:299–304.doi: 10.1016/j.it.2005.04.004

(151) Horenstein AL, Quarona V, Toscani D, Costa F, Chillemi A, Pistoia V, et al. Adenosine generated in the bone marrow niche through a CD38-mediated pathway correlates with progression of human myeloma. Mol Med. (2016) 22:694–704. doi: 10.2119/molmed.2016.00198

(152) Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. J Clin Invest. (2012) 122:3456–63.doi: 10.1172/JCI61188

(153) Manier S, Kawano Y, Bianchi G, Roccaro AM, Ghobrial IM. Cell autonomous and microenvironmental regulation of tumor progression in precursor states of multiple myeloma. Curr Opin Hematol. (2016) 23:426–33.doi: 10.1097/MOH.0000000000000259

(154) Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. J Clin Invest. (2013) 123:3664–71.doi: 10.1172/JCI67230

(155) Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell. (2008) 134:703–7. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021

(156) Bolzoni M, Toscani D, Costa F, Vicario E, Aversa F, Giuliani N. The link between bone microenvironment and immune cells in multiple myeloma: Emerging role of CD38. Immunol Lett. (2018) 205:65–70.doi: 10.1016/j.imlet.2018.04.007

(157) Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. Clin Cancer Res. (2008) 14:5947–52.doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0229

(158) Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Zito A, Roato I, Morandi F, et al. NAD+-Metabolizing ectoenzymes in remodeling tumorhost interactions: the human myeloma model. Cells. (2015) 4:520–37.doi: 10.3390/cells4030520

(159) Chillemi A, Quarona V, Antonioli L, Ferrari D, Horenstein AL, Malavasi F. Roles and modalities of ectonucleotidases in remodeling the multiple myeloma niche. Front Immunol. (2017) 8:305. doi: 10.3389/fimmu.2017.00305

(160) Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. Immunol Rev. (2007) 220:82–101. doi: 10.1111/j.1600 065X.2007.00566.x

(161) Sitkovsky MV, Hatfield S, Abbott R, Belikoff B, Lukashev D, Ohta A. Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists. Cancer Immunol Res. (2014) 2:598–605. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0075

(162) Milosevic M, Petrovic S, Velickovic N, Grkovic I, Ignjatovic M, Horvat A. ATP and ADP hydrolysis in cell membranes from rat myometrium.Mol Cell Biochem. (2012) 371:199–208. doi: 10.1007/s11010-012-1436-2

(163) Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. Genes Dis. (2017) 4:25–7. doi: 10.1016/j.gendis.2017.02.003

(164) Gordon EL, Pearson JD, Slakey LL. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. Feed-forward inhibition of adenosine production at the cell surface. J Biol Chem. (1986) 261:15496–507.

(165) Yuan S, Jiang X, Zhou X, Zhang Y, Teng T, Xie P. Inosine alleviates depression-like behavior and increases the activity of the ERK-CREB signaling in adolescent male rats. Neuroreport. (2018) 29:1223–9. doi: 10.1097/WNR.0000000000001101

(166) Barsotti C, Ipata PL. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. Int J Biochem Cell Biol. (2004) 36:2214–25. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.015

(167) Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J,Müller CE. International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors–an update. Pharmacol Rev. (2011) 63:1–34. doi: 10.1124/pr.110.003285

(168) Horenstein AL, Quarona V, Toscani D, Costa F, Chillemi A, Pistoia V, et al. Adenosine generated in the bone marrow niche through a CD38-mediated pathway correlates with progression of human myeloma. Mol Med. (2016) 22:694–704. doi: 10.2119/molmed.2016.00198

(168) Funaro A, Horenstein AL, Calosso L, Morra M, Tarocco RP, Franco L, et al. Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids. Int Immunol. (1996) 8:1643–50. doi: 10.1093/intimm/8.11.1643

(170) Ferrero E, Saccucci F, Malavasi F. The human CD38 gene: polymorphism, CpG island, and linkage to the CD157 (BST-1) gene. Immunogenetics. (1999) 49:597–604. doi: 10.1007/s002510050654

(171) Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. Bone. (2003) 32:1–7. doi: 10.1016/S8756-3282(02)00915-8

(172) Evans BA, Elford C, Pexa A, Francis K, Hughes AC, Deussen A, et al. Human osteoblast precursors produce extracellular adenosine, which modulates their secretion of IL-6 and osteoprotegerin. J BoneMiner Res. (2006) 21:228–36. doi: 10.1359/JBMR.051021

(173) Hunsucker SA, Magarotto V, Kuhn DJ, Kornblau SM, Wang M, Weber DM, et al. Blockade of interleukin-6 signalling with siltuximab enhances melphalan cytotoxicity in preclinical models of multiple myeloma. Br J Haematol. (2011) 152:579–92. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08533.x

(174) Burger R. Impact of interleukin-6 in hematological malignancies. Transfus Med Hemother. (2013) 40:336–43. doi: 10.1159/000354194

(175) Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol. (2005) 23:3412–20. doi: 10.1200/JCO.2005.04.242

(176) Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. Mayo Clin Proc. (2013) 88:360–76. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.01.019

(177) Kyrtsonis MC, Maltezas D, Tzenou T, Koulieris E, Bradwell AR. Staging systems and prognostic factors as a guide to therapeutic decisions in multiple myeloma. Semin Hematol. (2009) 46:110–7. doi: 10.1053/j.seminhematol.2009.02.004

(178) Arana P, Paiva B, Cedena MT, Puig N, Cordon L, Vidriales MB, et al. Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: a PETHEMA/GEMstudy on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials. Leukemia. (2018) 32:971–8. doi: 10.1038/leu.2017.320

(179) Moreno L, Perez C, Zabaleta A, Manrique I, Alignani D, Ajona D, et al. The mechanism of action of the anti-CD38 monoclonal antibody isatuximab in multiple myeloma. Clin Cancer Res. (2019). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1597. [Epubh ahead of print].

(180) Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. Physiol Rev. (2008) 88:841–86. doi: 10.1152/physrev.00035.2007

(181) Ferrero E, Lo Buono N, Horenstein AL, Funaro A, Malavasi F. The ADPribosyl cyclases– the current evolutionary state of the ARCs. Front Biosci. (2014) 19:986–1002. doi: 10.2741/4262

(182) Caligaris-Cappio F, Bergui L, Tesio L, Pizzolo G, Malavasi F, Chilosi M, et al. Identification of malignant plasma cell precursors in the bone marrow of multiple myeloma. J Clin Invest. (1985) 76:1243–51. doi: 10.1172/JCI112080

(183) van de Donk NW, Janmaat ML, Mutis T, Lammerts van Bueren JJ, Ahmadi T, Sasser AK, et al. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. Immunol Rev. (2016) 270:95–112. doi: 10.1111/imr.12389

(184) Frerichs KA, Nagy NA, Lindenbergh PL, Bosman P,Marin Soto J, Broekmans M, et al. CD38-targeting antibodies in multiple myeloma: mechanisms of action and clinical experience. Expert Rev Clin Immunol. (2018) 14:197–206. doi: 10.1080/1744666X.2018.1443809

(185) Castella B, Faini A, Yakymiv Y, Morandi F, Larocca A, Oliva S, et al. Induction of structural and functional effects of myeloma cells after daratumumab treatment. Cancer Res. 78(13 Suppl):2122. doi: 10.1158/1538-7445.AM2018-2122

(186) Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, Rabin N, Orlowski RZ, Komarnicki M, Suzuki K, Plesner T, Yoon SS, Ben Yehuda D, Richardson PG, Goldschmidt H, Reece D, Lisby S, Khokhar NZ, O'Rourke L, Chiu C, Qin X, Guckert M, Ahmadi T, Moreau P; POLLUX Investigators. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2016 Oct 6;375(14):1319-1331. doi: 10.1056/NEJMoa1607751. PMID: 27705267.

(187) Mateos MV, Dimopoulos MA, Cavo M, Suzuki K, Jakubowiak A, Knop S, Doyen C, Lucio P, Nagy Z, Kaplan P, Pour L, Cook M, Grosicki S, Crepaldi A, Liberati AM, Campbell P, Shelekhova T, Yoon SS, Iosava G, Fujisaki T, Garg M, Chiu C, Wang J, Carson R, Crist W, Deraedt W, Nguyen H, Qi M, San-Miguel J; ALCYONE Trial Investigators. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. N Engl J Med. 2018 Feb 8;378(6):518-528. doi: 10.1056/NEJMoa1714678. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29231133.

(188) Facon T, Kumar S, Plesner T, Orlowski RZ, Moreau P, Bahlis N, Basu S, Nahi H, Hulin C, Quach H, Goldschmidt H, O'Dwyer M, Perrot A, Venner CP, Weisel K, Mace

JR, Raje N, Attal M, Tiab M, Macro M, Frenzel L, Leleu X, Ahmadi T, Chiu C, Wang J, Van Rampelbergh R, Uhlar CM, Kobos R, Qi M, Usmani SZ; MAIA Trial Investigators. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. N Engl J Med. 2019 May 30;380(22):2104-2115. doi: 10.1056/NEJMoa1817249. PMID: 31141632.

(189) Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, Spicka I, Hungria V, Munder M, Mateos MV, Mark TM, Qi M, Schecter J, Amin H, Qin X, Deraedt W, Ahmadi T, Spencer A, Sonneveld P; CASTOR Investigators. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2016 Aug 25;375(8):754-66. doi: 10.1056/NEJMoa1606038. PMID: 27557302.

(190) Abdallah N, Kumar SK. Daratumumab in untreated newly diagnosed multiple myeloma. Ther Adv Hematol. 2019 Dec 23;10:2040620719894871. doi: 10.1177/2040620719894871. PMID: 31903177; PMCID: PMC6928545.

(191) M. M. Faas, T. Saez, and P. de Vos, “Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses?,” Molecular Aspects of Medicine, vol. 55, pp. 9–19, 2017.

(192) G. Hasko, C. Szabo, Z. H. Nemeth, V. Kvetan, S. M. Pastores, and E. S. Vizi, “Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-*α*, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice,” The Journal of Immunology, vol. 157, no. 10, pp. 4634–4640, 1996.

(193) J. Niemela, I. Ifergan, G. G. Yegutkin, S. Jalkanen, A. Prat, and L. Airas, “IFN-*β* regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier,” European Journal of Immunology, vol. 38, no. 10, pp. 2718–2726, 2008.

(194) J. M. Fletcher, R. Lonergan, L. Costelloe et al., “CD39+Foxp3+ regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis,” The Journal of Immunology, vol. 183, no. 11, pp. 7602–7610, 2009.

(195) P. Chrobak, R. Charlebois, P. Rejtar, R. El Bikai, B. Allard, and J. Stagg, “CD73 plays a protective role in collagen-induced arthritis,” The Journal of Immunology, vol. 194, no. 6, pp. 2487–2492, 2015.

(196) R. S. Peres, F. Y. Liew, J. Talbot et al., “Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 112, no. 8, pp. 2509–2514, 2015.

(197) F. Morandi, A. L. Horenstein, A. Chillemi et al., “CD56brightCD16- NK cells produce adenosine through a CD38-mediated pathway and act as regulatory cells inhibiting autologous CD4+ T cell proliferation,” The Journal of Immunology, vol. 195, no. 3, pp. 965–972, 2015.

(198) S. Botta Gordon-Smith, S. Ursu, S. Eaton, H. Moncrieffe, and L. R. Wedderburn, “Correlation of low CD73 expression on synovial lymphocytes with reduced adenosine generation and higher disease severity in juvenile idiopathic arthritis,” Arthritis & Rhematology, vol. 67, no. 2, pp. 545–554, 2015.

(199) D. J. Lee and A. W. Taylor, “Recovery from experimental autoimmune uveitis promotes induction of antiuveitic inducible Tregs,” Journal of Leukocyte Biology, vol. 97, no. 6, pp. 1101–1109, 2015.

(200) J. S. J. Chia, J. L. McRae, H. E. Thomas et al., “The protective effects of CD39 overexpression in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice,” Diabetes, vol. 62, no. 6, pp. 2026–2035, 2013.

(201) U. Flogel, S. Burghoff, P. L. E. M. van Lent et al., “Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis,” Science Translational Medicine, vol. 4, no. 146, article 146ra108, 2012.

(202) E. Baharav, S. Bar-Yehuda, L. Madi et al., “Antiinflammatory effect of A3 adenosine receptor agonists in murine autoimmune arthritis models,” The Journal of Rheumatology, vol. 32, no. 3, pp. 469–476, 2005.

(203) S. Bar-Yehuda, M. H. Silverman, W. D. Kerns, A. Ochaion, S. Cohen, and P. Fishman, “The anti-inflammatory effect of A3 adenosine receptor agonists: a novel targeted therapy for rheumatoid arthritis,” Expert Opinion on Investigational Drugs, vol. 16, no. 10, pp. 1601–1613, 2007.

(204) J. Ingwersen, B. Wingerath, J. Graf et al., “Dual roles of the adenosine A2a receptor in autoimmune neuroinflammation,” Journal of Neuroinflammation, vol. 13, no. 1, p. 48, 2016.

(205) S. Tsutsui, J. Schnermann, F. Noorbakhsh et al., “A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis,” The Journal of Neuroscience, vol. 24, no. 6, pp. 1521–1529, 2004.

(206) Z. H. Nemeth, D. Bleich, B. Csoka et al., “Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes,” The FASEB Journal, vol. 21, no. 10, pp. 2379–2388, 2007.

(207) S. Bar-Yehuda, D. Luger, A. Ochaion et al., “Inhibition of experimental autoimmune uveitis by the A3 adenosine receptor agonist CF101,” International Journal of Molecular Medicine, vol. 28, no. 5, pp. 727–731, 2011.

(208) M. Chen, D. Liang, A. Zuo, H. Shao, H. J. Kaplan, and D. Sun, “An A2B adenosine receptor agonist promotes Th17 autoimmune responses in experimental autoimmune uveitis (EAU) via dendritic cell activation,” PLoS One, vol. 10, no. 7, article e0132348, 2015.

(209) P. Fishman and S. Cohen, “The A3 adenosine receptor (A3AR): therapeutic target and predictive biological marker in rheumatoid arthritis,” Clinical Rheumatology, vol. 35, no. 9, pp. 2359–2362, 2016.

(210) M. H. Silverman, V. Strand, D. Markovits et al., “Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial,” The Journal of Rheumatology, vol. 35, no. 1, pp. 41–48, 2008.

(211) Asano Y, Varga J. Rationally-based therapeutic disease modification in systemic sclerosis: novel strategies. Semin Cell Dev Biol 2020; 101:146–160.

(212) Grammatikos AP, Tsokos GC. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. Trends Mol Med 2012; 18:101–108.

(213) Chini CCS, Tarrago´ MG, Chini EN. NAD and the aging process: role in life, death and everything in between. Mol Cell Endocrinol 2017; 455:62–74.

(214) Tarrago´ MG, Chini CCS, Kanamori KS, et al. A potent and specific CD38 inhibitor ameliorates age-related metabolic dysfunction by reversing tissue NAD. Cell Metab 2018; 27:1081.e10–1095.e10.

(215) Shi B, Wang W, Korman B et al. Targeting CD38-dependent NADþ metabolism to mitigate multiple organ fibrosis. Available at SSRN: https://ssrn.com/abstract=3606762 or http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3606762.2020.

(216) Katsuyama E, Suarez-Fueyo A, Bradley SJ, et al. The CD38/NAD/SIRTUIN1/ EZH2 axis mitigates cytotoxic CD8 T cell function and identifies patients with SLE prone to infections. Cell Rep 2020; 30:112.e4–123.e4.

(217) Katsyuba E, Romani M, Hofer D, Auwerx J. NADþ homeostasis in health and disease. Nat Metab 2020; 2:9–31.

(218) Frerichs KA, Verkleij CPM, Bosman PWC, et al. CD38-targeted therapy with daratumumab reduces autoantibody levels in multiple myeloma patients. J Transl Autoimmun 2019; 2:100022.

(219) Cole S, Walsh A, Yin X, et al. Integrative analysis reveals CD38 as a

therapeutic target for plasma cell-rich predisease and established rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther 2018; 20:85.

(220) Shi H, Enriquez A, Rapadas M, et al. NAD deficiency, congenital malformations, and niacin supplementation. N Engl J Med 2017; 377:544–552.

(221) Poyan Mehr A, Tran MT, Ralto KM, et al. De novo NADþ biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans. Nat Med 2018; 24:1351–1359.

(222) Bulluck H, Hausenloy DJ. Modulating NADþ metabolism to prevent acute kidney injury. Nat Med 2018; 24:1306–1307.

(223) Pirinen E, Auranen M, Khan NA, et al. Niacin cures systemic NAD þ deficiency and improves muscle performance in adult-onset mitochondrial myopathy. Cell Metab 2020; 31:1078.e5–1090.e5.

(224) Wyman AE, Atamas SP. Sirtuins and accelerated aging in scleroderma. Curr Rheumatol Rep 2018; 20:16.

(225) Rajman L, Chwalek K, Sinclair DA. Therapeutic potential of NAD-boosting molecules: the in vivo evidence. Cell Metab 2018; 27:529–547.

(226) Chini EN. Of mice and men: NADþ boosting with niacin provides hope for mitochondrial myopathy Patients. Cell Metab 2020; 31:1041–1043.

(227) Volkmann ER, Varga J. Emerging targets of disease-modifying therapy for systemic sclerosis. Nat Rev Rheumatol 2019; 15:208–224.

(228) Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. Nat Rev Rheumatol 2011; 8:42–54.

(229) Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. Nat Med 2012; 18:1028–1040.

(230) Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. Am J Pathol 2012; 180:1340–1355.

(231) Distler JHW, Gyo¨ rfi AH, Ramanujam M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. Nat Rev Rheumatol 2019; 15:705–730.

(232) Wei J, Ghosh AK, Chu H, et al. The histone deacetylase sirtuin 1 is reduced in systemic sclerosis and abrogates fibrotic responses by targeting transforming egrowth factor b signaling. Arthritis Rheumatol 2015; 67: 1323–1334.

(233) Eckert MA, Coscia F, Chryplewicz A, et al. Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. Nature 2019; 569:723–728.

(234) Ostendorf L, Burns M, Durek P, Heinz GA, Heinrich F, Garantziotis P, Enghard P, Richter U, Biesen R, Schneider U, Knebel F, Burmester G, Radbruch A, Mei HE, Mashreghi MF, Hiepe F, Alexander T. Targeting CD38 with Daratumumab in Refractory Systemic Lupus Erythematosus. N Engl J Med. 2020 Sep 17;383(12):1149-1155. doi: 10.1056/NEJMoa2023325. PMID: 32937047.

(235) Svegliati Baroni S, Santillo MR Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A, Avvedimento EV, Gabrielli A Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. N Engl J Med 354; 2667-76, 2006

(236) Streicher K, Sridhar S, Kuziora M, Morehouse CA, Higgs BW, Sebastian Y, Groves CJ, Pilataxi F, Brohawn PZ, Herbst R, Ranade K. Baseline Plasma Cell Gene Signature Predicts Improvement in Systemic Sclerosis Skin Scores Following Treatment With Inebilizumab (MEDI-551) and Correlates With Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Arthritis Rheumatol. 2018 Dec;70(12):2087-2095

(237) Morandi F, Horenstein AL, Costa F, Giuliani N, Pistoia V, Malavasi F. CD38: A Target for Immunotherapeutic Approaches in Multiple Myeloma. Front Immunol. 2018 Nov 28;9:2722)

(238) Gumkowska-Sroka O, Jagoda K, Owczarek A, Helbig G, Giemza-Stokłosa J, Kotyla PJ. Cytometric Characterization of Main Immunocompetent Cells in Patients with Systemic Sclerosis: Relationship with Disease Activity and Type of Immunosuppressive Treatment. J Clin Med. 2019 May 8;8(5):625. doi: 10.3390/jcm8050625. PMID: 31071980; PMCID: PMC6571868

(239) Dumoitier, N.; Chaigne, B.; Regent, A.; Lofek, S.; Mhibik, M.; Dorfmuller, P.; Terrier, B.; London, J.; Berezne, A.; Tamas, N.; et al. Scleroderma peripheral B lymphocytes secrete interleukin-6 and transforming growth factor beta and activate fibroblasts. Arthritis Rheumatol. 2017, 69, 1078–1089.

(240) Yoshizaki, A. Pathogenic roles of B lymphocytes in systemic sclerosis. Immunol. Lett. 2018, 195, 76–82

(241) Forestier, A.; Guerrier, T.; Jouvray, M.; Giovannelli, J.; Lefevre, G.; Sobanski, V.; Hauspie, C.; Hachulla, E.; Hatron, P.Y.; Zephir, H.; et al. Altered B lymphocyte homeostasis and functions in systemic sclerosis. Autoimmun. Rev. 2018, 17, 244–255

(242) Narváez J, LLuch J, Molina-Molina M, Vicens-Zygmunt V, Luburich P, Yañez MA, Nolla JM. Rituximab as a rescue treatment added on mycophenolate mofetil background therapy in progressive systemic sclerosis associated interstitial lung disease unresponsive to conventional immunosuppression. Semin Arthritis Rheum. 2020 Aug 8;50(5):977-987. doi: 10.1016/j.semarthrit.2020.08.004. Epub ahead of print. PMID: 32911289.

(243) Erre GL, Sebastiani M, Fenu MA, Zinellu A, Floris A, Cavagna L, Renzoni E, Manfredi A, Passiu G, Woodman RJ, Mangoni AA. Efficacy, Safety, and Tolerability of Treatments for Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. J Clin Med. 2020 Aug 7;9(8):2560. doi: 10.3390/jcm9082560. PMID: 32784580; PMCID: PMC7465266.

(244) Peclat TR, Shi B, Varga J, Chini EN. The NADase enzyme CD38: an emerging pharmacological target for systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol. 2020 Nov;32(6):488-496. doi: 10.1097/BOR.0000000000000737. PMID: 32941246.

(245) Hogan KA, Chini CCS, Chini EN. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. Front Immunol. 2019 May 31;10:1187. doi: 10.3389/fimmu.2019.01187. PMID: 31214171; PMCID: PMC6555258

(246) Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. Nat Immunol. 2018 Jul;19(7):665-673. doi: 10.1038/s41590-018-0120-4. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29925983