
Indice

1. INTRODUZIONE

1.1 Sclerosi sistemica	4
1.1.1 Epidemiologia	4
1.1.2 Eziopatogenesi	5
1.1.3 Patogenesi	6
1.1.4 Lesioni anatomopatologiche	10
1.1.5 Manifestazioni cliniche	11
1.1.6 Diagnosi.....	16
1.1.7 Terapia	17
1.1.8 Prognosi.....	19
1.2 Fattore di crescita derivato dalle piastrine e il suo recettore	20
1.2.1 Ruolo del PDGF nella sclerodermia	21
1.2.2 Anticorpi contro il recettore PDGF	23
1.3 Modelli sperimentali animali di SSc	29
1.3.1 Un nuovo modello murino umanizzato di SSc	35

2. SCOPO DELLA RICERCA **38**

3. MATERIALI E METODI

3.1 Allevamento e cura degli animali	39
3.2 Somministrazione endovenosa di anticorpi monoclonali anti-PDGFRα umano: Dose finding	39
3.3 Doppia somministrazione endovenosa di anticorpi monoclonali anti-PDGFRα umano	40

3.4 Monitoraggio degli animali e campionamento	41
3.5 Analisi istologiche	42
3.6 Determinazione dell'espressione di collagene nei tessuti murini	42
3.7 Quantificazione dell'espressione del PDGFR α umano e murino nei tessuti di topo	43
3.8 Titolazione di anticorpi murini diretti contro gli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano inoculati.....	44
3.9 Analisi statistica.....	44

4. RISULTATI

4.1 Induzione di fibrosi cutanea e polmonare mediante singola iniezione endovenosa di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano	45
4.2 Titolo degli anticorpi murini diretti contro gli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano	50
4.3 Induzione di fibrosi cutanea e polmonare mediante doppia iniezione endovenosa di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano.....	52

5. DISCUSSIONE 57

6. BIBLIOGRAFIA 59

1. Introduzione

1.1 Sclerosi sistemica

La sclerodermia (SSc) è una malattia sistemica autoimmune classificata tra le connettiviti. Questa malattia è caratterizzata dalla più alta mortalità e morbidità tra le malattie reumatologiche che determina una notevole compromissione della qualità della vita dei pazienti [1]. La patofisiologia prevede un meccanismo complesso, con la partecipazione di diversi fattori come il corredo genetico, l'influenza dell'ambiente, la funzionalità del sistema immunitario e vascolare, nonché dei fibroblasti e della matrice extracellulare. A livello istologico questa patologia è caratterizzata principalmente da alterazioni microvascolari, e da accumulo di collagene e di altri componenti della matrice connettivale a carico della cute, dell'apparato muscolo-scheletrico (articolazioni, tendini, muscoli) e di vari organi interni (polmoni, cuore, rene e dell'apparato gastrointestinale in particolar modo esofago).

1.1.1 Epidemiologia

Gli studi epidemiologici nell'ambito della sclerosi sistemica sono insufficienti e caratterizzati da una grande variabilità nelle stime di prevalenza e incidenza, ciò è dovuto sia alla rarità della malattia, sia all'evoluzione dei criteri di classificazione nel corso del tempo. I tassi complessivi, per quanto riguarda l'incidenza, variano globalmente da 2.3 a 22.8 nuovi casi / milione / anno. La prevalenza, da quanto emerge nelle recenti relazioni, è compresa tra 50 e 300 casi / milione totali [2]. L'incidenza è in costante aumento nel tempo, che potrebbe essere attribuito al miglioramento, finora significativo, della sopravvivenza. I tassi di incidenza e prevalenza più alti si possono osservare in Europa, seguono Nord America, Centro e Sud America mentre i tassi più bassi si hanno in Asia [3].

Nell'Europa meridionale, l'incidenza segnalata è leggermente aumentata nei due decenni precedenti e successivi al 2000 (11-23 rispetto a 19-43 nuovi casi/ milione/ anno, rispettivamente) [4].

Colpisce con maggiore frequenza in una fascia d'età compresa tra i 30 e i 50 anni ed è più frequente nel sesso femminile con un indice che varia da 3:1 a 14:1 [2][5][6].

Per quanto riguarda la diffusione della malattia in Italia, l'ultimo studio effettuato ci riporta un tasso di prevalenza di 34,1 casi per 100.000 e un tasso di incidenza annuale di 4,3 per 100.000 (criteri LeRoy e Medsger 2001) [7].

1.1.2 Eziopatogenesi

L'eziologia della sclerodermia a oggi non è ancora del tutto chiarita, ma come in altre malattie autoimmuni, si presuppone che la suscettibilità genetica, insieme a diversi fattori esterni, possa innescare una serie di eventi che implicano principalmente autoimmunità e disfunzione microvascolare, che alla fine portano alla fibrosi e alle manifestazioni cliniche della SSc.

A supporto dell'importanza della genetica nell'eziopatogenesi ci sono i dati dell'aggregazione familiare, questa è presente nel 1,2% -1,5% dei casi (2,6% nei fratelli), rispetto a 0.026% nella popolazione generale [8]. Infatti, il rischio di sviluppare la SSc è stato stimato essere 13 volte più alto nei parenti di primo grado dei pazienti e 15 volte più alto nei fratelli rispetto a quello nella popolazione generale [9]. Gli studi condotti su gemelli mostrano concordanze relativamente basse nello sviluppo di malattia (4.2% nei monozigotici e 5,6% nei dizigotici), ma concordanze ben più elevate per quanto riguarda la presenza di autoanticorpi [10].

Recenti studi (GWAS) hanno individuato alcuni dei fattori di suscettibilità genetica. I primi a essere stati scoperti sono stati alcuni alleli del complesso maggiore di istocompatibilità HLA tipo II. In particolare è stata rilevata un'associazione tra i loci del gene HLA con specifici anticorpi (per esempio l'allele DPB1 * 1301 è associato alla probabilità di sviluppare anti-topoisomerasi 1 (anti-topo 1), anti-fibrillarina con DRB1 * 1302).

L'associazione con i geni non-HLA sembra essere modesta, ma il fatto risaltante è l'implicazione di questi geni in vari pathway rilevanti nella patogenesi della sclerodermia. Questi geni associati codificano alcune proteine coinvolte

nell'elaborazione della risposta immunitaria, nella presentazione dell'antigene e nell'infiammazione, nella differenziazione e attivazione delle cellule T e dell'immunità innata [11]. Inoltre, molti di questi geni sono stati associati anche ad altri disturbi autoimmuni (ad es. Lupus eritematoso sistemico, patologia tiroidea, diabete mellito tipo 1) [12].

Esiste un'ipotesi infettiva avvalorata dalla correlazione statistica di alcune infezioni con lo sviluppo della malattia. Gli agenti virali per i quali sono presenti in letteratura maggiori evidenze sono il Citomegalovirus, il Parvovirus B19, l'EBV. Recentemente, l'interesse di alcuni gruppi di studio si sta spostando anche verso gli adenovirus [13].

1.1.3 Patogenesi

Nella patogenesi della malattia sembrano centrali: il danno endoteliale, l'eccessiva produzione e deposizione di collagene da parte dei fibroblasti, lo stress ossidativo e la produzione di ROS (radicali liberi dell'ossigeno), il ruolo della risposta autoimmune, che riflette l'attivazione coordinata della reazione immunitaria innata e adattativa [14].

Il danno endoteliale è presente sin dalle prime fasi della malattia e coinvolge il tratto microvascolare, in particolare le arteriole. La transizione endotelio-mesenchimale (EndoMT) potrebbe rappresentare un legame cruciale tra la disfunzione delle cellule endoteliali (EC) e lo sviluppo della fibrosi. EndoMT è una conversione fenotipica in cui le EC sottoregolano l'espressione dei loro marcatori specifici, come la molecola di adesione CD31/ piastrinica-EC-1, il fattore di von Willebrand (vWF) e caderina vascolare endoteliale (VE) e acquisiscono marcatori mesenchimali tra cui α -SMA, S100A4/ fibroblast specific protein 1 (FSP1) e collagene di tipo I, insieme alla stabilizzazione e traslocazione nucleare del regolatore trascrizionale Snail1, un fattore determinante della transizione mesenchimale. Questa evidenza è stata dimostrata da Matucci *et al.* In uno studio condotto su pazienti con SSc e due modelli murini di malattia [15].

Per quanto riguarda l'aumentata produzione di matrice extracellulare recenti studi (Le Roy *et al.*) hanno dimostrato che i fibroblasti dei pazienti con sclerodermia in vitro producono una quantità di collagene 2-4 volte maggiore rispetto al normale, anche in

assenza di stimoli esogeni [16]. Questi fibroblasti presentano anche alterazioni strutturali che conferiscono loro un fenotipo miofibroblastico pro-fibrotico, caratterizzato da un'aumentata espressione dell'RNA messaggero per l' α -actina del muscolo-liscio e per il collagene [17].

Tra i meccanismi non immunologici di danno endoteliale è stata rivolta particolare attenzione ai radicali liberi dell'ossigeno (in particolare al perossido d'idrogeno), questi nella sclerodermia vengono prodotti soprattutto dopo i fenomeni di ischemia-riperfusion secondari al fenomeno di Raynaud. Le cellule endoteliali sono particolarmente sensibili all'azione tossica dei ROS poiché sono prive della catalasi [18]. Studi recenti hanno dimostrato che i fibroblasti dei pazienti con SSc producono, in vitro, alti livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Lo stress ossidativo che ne risulta induce l'attivazione di fibroblasti, con conseguente aumento del tasso di proliferazione e aumento della trascrizione dei geni del collagene. I ROS sono anche in grado di indurre l'espressione e la stabilizzazione della proteina Ras, attraverso l'attivazione delle chinasi regolate dal segnale extracellulare (ERK1 / 2) [19].

È noto che la produzione di ROS può anche essere innescata dal legame del PDGF al suo recettore espresso sulla superficie cellulare dei fibroblasti e dalla successiva attivazione della NADPH ossidasi.

La risposta immunitaria adattativa viene severamente alterata nella sclerosi sistemica e numerosi studi sostengono un ruolo di primo piano esercitato dagli effettori dell'immunità cellulo-mediata e dai mediatori umorali nella patogenesi di questa malattia. Questi includono (i) la presenza di linfociti T oligoclonali nei tessuti andati incontro alla fibrosi, conseguente al reclutamento antigene-specifico, (ii) l'espansione preferenziale di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ che producono citochine pro-fibrotiche come IL-4 e IL-13, (iii) la presenza di un numero maggiore di cellule che producono mediatori appartenenti alla famiglia IL-17, incluso IL-22, che possono guidare e partecipare a percorsi infiammatori che coinvolgono anche le cellule epiteliali e i fibroblasti, (iv) il deficit o l'alterazione della funzione delle cellule regolatorie T che favoriscono la fibrosi e (v) l'espressione potenziata di CD19 e CD21 su cellule B naïve e l'upregolazione delle molecole di co-stimolazione nelle cellule B mature, che insieme all'aumento dei livelli di fattore di attivazione delle cellule B (BAFF) sono alla base

della propensione a una risposta umorale esagerata che potrebbe favorire la fibrogenesi [20].

L'attività di queste cellule potrebbe essere responsabile della fibrosi e del danno endoteliale nei pazienti con SSc, attraverso la produzione di mediatori solubili o effetti citotossici. Nella SSc è stata dimostrata una produzione citochinica prevalentemente di tipo Th2, con aumento significativo di IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 [21]. Inoltre, il livello plasmatico della proteina chemioattrattante i monociti-1 (MCP-1) è significativamente aumentato nel corso della sclerodermia, contribuendo allo squilibrio verso il fenotipo Th2. In effetti, l'MCP-1 è un importante fattore pro-fibrotico in vitro ed è stato dimostrato che regola la migrazione dei monociti e dei linfociti Th2 nei siti di infiammazione [22].

Sembrerebbero coinvolti nella patogenesi della sclerosi sistemica anche i linfociti B. L'analisi del repertorio di cellule B circolanti in SSc ha mostrato l'espansione del sottoinsieme di cellule B naïve (CD27-) e il concomitante declino delle cellule B di memoria e dei componenti plasmacellulari. Tuttavia, sia le cellule B naïve che quelle a memoria dei pazienti con SSc hanno sovraespresso un regolatore di risposta positiva come il CD19; la perdita di espressione di CD19 attenua la fibrosi della pelle e del polmone nel modello di topo SSc indotto dalla bleomicina. I membri della superfamiglia del fattore di necrosi tumorale (TNF) che esercitano importanti funzioni omeostatiche su cellule B, BAFF e APRIL (un ligando che induce la proliferazione), sono aumentati nei pazienti con SSc e associati a specifiche manifestazioni cliniche come l'entità del coinvolgimento cutaneo e la presenza di fibrosi polmonare. Inoltre, è stato dimostrato che le cellule B inducono l'attivazione dei fibroblasti dermici umani dipendenti dal contatto e l'upregulation del collagene di tipo I [20][23].

L'SSc è caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi circolanti verso diversi componenti sia cellulari che extracellulari. Circa il 95% dei pazienti con SSc presentano nel siero autoanticorpi rilevabili, che nella maggior parte dei casi sono altamente specifici per la malattia. Gli antigeni target per gli anticorpi più frequentemente riscontrabili sono tutti intranucleari, ma non hanno un ruolo dimostrato nella patogenesi. Un nuovo gruppo di autoanticorpi diretti contro alcuni recettori della superficie cellulare è stato identificato nei pazienti con SSc. È stato dimostrato che attivano direttamente le vie che possono contribuire al danno tissutale e vascolare [9].

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA) sono presenti in oltre il 90% dei pazienti con SSc e sono reattivi contro vari componenti. Gli anticorpi anti-centromero (ACA) e gli anticorpi anti-topoisomerasi I (anti-topo I) sono i classici ANA presenti in SSc [24].

- Sebbene la frequenza di ACA nei pazienti con SSc sia stata complessivamente del 20-30%, la loro presenza è predittiva per lo sviluppo dell'ipertensione polmonare ma non per la fibrosi polmonare [25][26]. I pazienti con SSc positivi per ACA possiedono una prognosi più favorevole (associata a un coinvolgimento cutaneo limitato) rispetto ai pazienti con altri ANA correlati a SSc [26].

- Anticorpi anti-topo I sono stati trovati in circa il 40% dei pazienti con SSc forma diffusa, ma in meno del 10% dei pazienti con forma limitata. L'anti-topo I di solito non si trova in soggetti sani, in pazienti con altre malattie del connettivo o sindrome di Raynaud primaria [27]. Sono associati a un rischio più elevato di fibrosi polmonare grave nelle prime fasi della malattia. Studi *in vitro* hanno rivelato effetti patogenetici diretti di questi autoanticorpi trovati nella SSc. Henault *et al* hanno riferito che l'autoantigene topoisomerasi I lega in modo specifico i fibroblasti, e il legame dell'anti topo I ha successivamente stimolato l'adesione e l'attivazione dei monociti in coltura[28]. Pertanto, è possibile che, *in vivo*, la topoisomerasi I, rilasciato dalle cellule endoteliali apoptotiche, si leghi alle superfici dei fibroblasti, recluta l'anti-topo I e induce successivamente l'adesione e l'attivazione dei monociti, portando allo sviluppo di SSc.

L'altro gruppo di autoanticorpi rilevabili nel siero dei pazienti affetti da SSc sono diretti contro i recettori di superficie e includono gli anticorpi anti-endoteliali (AECA), il recettore anti-angiotensina II tipo 1 (AT1R), il recettore anti-endotelina-1 tipo A (ETaR) e una nuova classe di autoanticorpi antagonisti, anticorpi contro il recettore anti-muscarinico-3 (M3R).

- gli AECA hanno un potenziale ruolo patogeno nell'attivazione delle cellule endoteliali, aumentandone l'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1 e delle citokine infiammatorie IL-1, IL-6 e MCP-1, con conseguente danno vascolare

- AT1R e ETaR sono espresse in modo ubiquitario sulla superficie delle cellule vascolari e immunitarie. Sono stati trovati anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR in circa

l'85% dei pazienti con SSc. Livelli più elevati di anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sono stati associati a gravi manifestazioni vascolari SSc come ulcere digitali e PAH. Nelle cellule endoteliali cutanee umane questi autoanticorpi inducono la fosforilazione di ERK1 / 2 e aumentano l'espressione del gene TGF β ; il loro ruolo è stato testato anche *in vivo*.

- Siccome la stimolazione del recettore muscarinico-3 (M3R) è il principale meccanismo nervoso eccitatorio del tratto gastro-intestinale, gli autoanticorpi anti-M3R possono portare al fallimento della neurotrasmissione colinergica e, a sua volta, provocare disfunzione della motilità gastrointestinale. Diversi studi hanno riscontrato un'alta incidenza di anticorpi neuronali anti-mioenterici nei sieri dei pazienti con SSc con sintomi gastrointestinali [29].

1.1.4 Lesioni anatomopatologiche

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

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

Nelle lesioni precoci della sclerodermia i periciti sovraesprimono diversi recettori delle citochine compreso il recettore del PDGF. Queste cellule insieme alle cellule muscolari lisce proliferano e contribuiscono ad aumentare lo spessore delle pareti.

I fibroblasti sono i responsabili della produzione, deposizione e rimodellamento del collagene e degli altri componenti della matrice extracellulare come la fibronectina e fibrillina. La disposizione macromolecolare del collagene nella sclerodermia è caratterizzata da legami incrociati che si verificano fisiologicamente nella matrice ossea ma non nella cute, questi legami crociati sono formati dalla lisil-idrossilasi 2, il cui livello è aumentato nella sclerodermia.

La fibrosi della cute inizia nel derma inferiore e nello strato sottocutaneo superiore e si verifica insieme alla rarefazione del microcircolo. La composizione della matrice varia nel corso della patologia, si riscontrano inizialmente una miscela di diversi tipi di collagene, proteoglicani, e le fibre elastiche compresa la fibrillina, mentre il collagene di tipo I si accumula nelle fasi successive.

Gli infiltrati cellulari della sclerodermia sono costituiti principalmente da linfociti T, macrofagi, linfociti B (anche CD20+) e mastociti. I linfociti T nelle lesioni cutanee sono prevalentemente CD4 + Th2 [30].

1.1.5 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche della sclerosi sistemica sono l'espressione della vasculopatia e della fibrosi dei parenchimi colpiti, ma sono frequenti anche le manifestazioni generali: astenia, calo di peso, e più raramente la febbre.

In base all'estensione dell'interessamento cutaneo e al tipo di interessamento di organo, la malattia viene suddivisa in 3 forme: SSc cutanea limitata, SSc cutanea diffusa e SSc senza coinvolgimento cutaneo [31].

Nella forma cutanea limitata la fibrosi è principalmente limitata a mani, braccia e viso. Il fenomeno di Raynaud anticipa da diversi anni la fibrosi ed è più frequente l'ipertensione polmonare. Dal punto di vista sierologico si caratterizza per una positività degli anticorpi anti-centromero nel 70-80% dei pazienti, mentre alla capillaroscopia si evidenziano dilatazioni delle anse capillari, in assenza di perdita degli stessi. La prognosi è migliore rispetto ai pazienti con la variante diffusa, in quanto presenta un decorso più benigno [32].

La SSc cutanea diffusa è una variante rapidamente progressiva che di solito esordisce con un gonfiore simmetrico delle dita e delle mani che si generalizza progressivamente fino a coinvolgere gli avambracci, le braccia, il viso, il tronco e le estremità inferiori. Successivamente l'edema diventa compatto e poi evolve in una fibrosi deformante. Il coinvolgimento degli organi interni è precoce e compromette uno o più organi. Caratteristica è la presenza di positività degli anticorpi anti-topoisomerasi I ed il riscontro capillaroscopico di dilatazione e rarefazione dei capillari periungueali [32].

La sclerosi sistemica sine scleroderma, presente in una minoranza di questi pazienti (<5%) si presenta con delle lesioni e autoanticorpi caratteristici per la sclerosi sistemica, ma non si attesta un coinvolgimento cutaneo. In alcuni pazienti si osservano manifestazioni organiche della malattia, che potrebbe includere fibrosi polmonare, ipertensione arteriosa polmonare, insufficienza renale oppure complicanze gastrointestinali. La sierologia immunitaria può risultare positiva sia per gli anticorpi anti-topoisomerasi I che per gli anticorpi anti-centromero [33][34].

La sclerosi sistemica (SSc) si caratterizza da un punto di vista laboratoristico con delle alterazioni dovute all'infiammazione cronica come aumento della VES, anemia e ipergammaglobulinemia policlonale. L'esordio della patologia è spesso subdolo e il primo segno a comparire è nella maggior parte dei casi il fenomeno di Raynaud presente in circa l'80-95% dei casi [33].

Fenomeno di Raynaud

Il fenomeno di Raynaud è un evento vasospastico parossistico delle arteriole delle mani e dei piedi, può essere scatenato dal freddo, dal contatto con l'acqua, dalle vibrazioni o da particolari stati emotivi. Nella sclerodermia la sua manifestazione è più frequentemente bifasica o trifasica: fase ischemica da vasospasmo, fase cianotica, con o senza fase iperemica reattiva dovuto alla successiva rivascolarizzazione, però è un sintomo aspecifico. Nel lungo periodo il fenomeno di Raynaud comporta quasi sempre la comparsa di ulcere acrali e necrosi cutanea, fino all'amputazione [35].

Cute

Nelle fasi precoci della malattia la cute delle mani e degli avambracci è colpita da un edema simmetrico, duro, talvolta associato ad eritema. Tale fenomeno prende il nome di

“puffy fingers” a causa dell’aspetto particolarmente tozzo assunto dalle dita delle mani. Dopo un periodo di settimane o di mesi, l’iniziale fase di edema lascia spazio ad una fase intermedia fibrotica caratterizzata da un progressivo ispessimento cutaneo. La cute diventa lucida, tesa, e strettamente aderente al sottocute compromettendo la mobilità di muscoli, tendini ed articolazioni e presenta alterazioni pigmentarie.

Il paziente assume la tipica “facies sclerodermica” caratterizzata da: microstomia, labbra fini e raggrinzite, cute tesa ed anelastica, perdita delle rughe e della mimica facciale, possibile presenza di teleangectasie al volto. Si assiste alla progressiva scomparsa dei peli, delle secrezioni sebacee e della sudorazione. Sono inoltre osservabili tipiche discromie o aree di depigmentazione. Poiché nelle zone perifollicolari la perdita di pigmento è risparmiata, la cute assume un aspetto a “sale e pepe”. Le dita assumono un caratteristico atteggiamento in flessione (dita ad artiglio). Le ulcere cutanee sono presenti in circa 35% dei pazienti e si localizzano soprattutto a livello acrale e delle prominenze ossee sulle superfici estensorie degli arti [4].

A distanza di anni dall’esordio, nella fase terminale della malattia, la cute può tornare ad ammorbidirsi e assume un aspetto sottile e atrofico[36].

Apparato respiratorio

In più del 50% dei pazienti nel corso della storia clinica della malattia è presente un interessamento polmonare che si è dimostrato essere la principale causa di morte in questi pazienti [4].

Clinicamente si manifesta con dispnea da sforzo, spesso accompagnata da tosse cronica stizzosa. All’esame obiettivo sono riscontrabili rantoli crepitanti teleinspiratori alle basi polmonari.

Il segno radiologico classico è dato da una pneumopatia infiltrativa diffusa prevalente alle basi con successiva evoluzione in fibrosi diffusa. Nelle fasi precoci della malattia si evidenzia un quadro di “ground glass” indicativo di alveolite, seguita, dopo un periodo di tempo variabile, da una fase terminale irreversibile di fibrosi polmonare evidenziabile come “polmone a nido d’ape” [37].

La spirometria può evidenziare un quadro respiratorio di tipo restrittivo e una ridotta diffusione del monossido di carbonio (DLCO), imputabile a un quadro di ILD (interstitial lung disease) [23].

Il lavaggio broncoalveolare (BAL) rivela un elevato numero di cellule rappresentate da macrofagi alveolari, neutrofili ed eosinofili.

Oltre alla fibrosi polmonare i pazienti affetti da sclerodermia possono andare incontro all'ipertensione polmonare con cuore polmonare cronico e insufficienza cardiaca destra, anche quando la fibrosi polmonare non è presente. Questi pazienti presentano un peggioramento del DLCO molto marcato rispetto al peggioramento del FVC (capacità vitale forzata), un rapido aggravamento della dispnea e della qualità della vita [38].

Apparato osteo-articolare

Nell'80-90% dei casi è presente artropatia ma solo nel 15% dei casi si riscontra una franca sinovite, più frequentemente si tratta di poliartralgie. Esistono 3 pattern clinici mutuamente escludenti: infiammatorio-similreumatoide, degenerativo-similartrorico, fibrotico periarticolare. Quest'ultimo è il più caratteristico ed è dovuto alla fibrosi e calcinosi dei tessuti periarticolari che determinano un atteggiamento in flessione. La manifestazione osteoarticolare più caratteristica della malattia è l'osteolisi della falange distale delle dita delle mani su base ischemica [4].

Apparato gastroenterico

Circa il 90% dei pazienti sclerodermici presenta un interessamento esofageo, caratterizzato dalla riduzione o la scomparsa della peristalsi del terzo distale dell'esofago, causata da un deficit nella trasmissione neuromuscolare e da una progressiva ipotonia dello sfintere esofageo inferiore. Queste si manifestano clinicamente con rigurgito, pirosi retrosternale e con disfagia da rallentata motilità, in particolare per i cibi solidi [4].

Il coinvolgimento dell'intestino è molto più raro e si presenta con gonfiore, dolore addominale e la comparsa di una sindrome da malassorbimento. I sintomi sono da attribuirsi ad un'eccessiva crescita batterica secondaria al rallentato transito nell'intestino atonico e all'ostruzione dei vasi linfatici in seguito alla progressiva fibrosi

di parete. A livello dell'intestino crasso i disturbi principali possono essere stipsi cronica e formazione di fecalomi, con episodi di ostruzione intestinale e diverticolosi. Può comparire infine uno stato di disfunzione anorettale, con conseguente incontinenza [39][40].

Cuore

Studi autoptici e con risonanza magnetica cardiaca hanno dimostrato che il cuore è frequentemente interessato in corso di sclerosi sistemica, anche se solo nel 20% dei casi comporta una manifestazione clinica [41].

Si possono distinguere un coinvolgimento primario dovuto alla progressiva sostituzione fibrotica del pericardio, del miocardio o delle arterie coronariche intramiocardiche, e un coinvolgimento cardiaco secondario dovuto a pneumopatia infiltrativa diffusa o a ipertensione arteriosa polmonare [41].

Reni

Il 5% dei soggetti affetti da SSc viene colpito da una complicanza molto grave, denominata crisi renale sclerodermica che è caratterizzata dal rapido instaurarsi di un'emergenza ipertensiva seguita immediatamente da un'insufficienza renale rapidamente progressiva. I fattori predittivi di crisi renale sono: forma diffusa di SSc, esordio precoce, presenza di anticorpi anti-topo-1 o anti-RNA polimerasi 3.

Il quadro clinico e laboratoristico è caratterizzato da un incremento notevole della pressione arteriosa, dalla comparsa di un'insufficienza renale acuta, dal raddoppio dell'attività reninica plasmatica, da anemia emolitica microangiopatica, da piastrinopenia e da insufficienza cardiaca [42].

Neoplasie

Le più recenti meta-analisi hanno mostrato che, rispetto alla popolazione generale, il rischio relativo (RR) di sviluppare qualsiasi tumore invasivo nei pazienti con SSc è 1.41-1.75, mentre il rischio relativo per il cancro del polmone è 4.35 e per le neoplasie ematologiche 2.24 [43].

Altre manifestazioni

Nei pazienti affetti da sclerosi sistemica è possibile riscontrare xerostomia e/o xeroftalmia, insieme ad altre manifestazioni autoimmunitarie come l'ipotiroidismo e la cirrosi biliare primitiva. Anche la funzione sessuale è spesso compromessa nella sclerodermia indipendentemente dal sesso: fino all'80% dei pazienti maschi riportano disfunzione erettile, mentre i cambiamenti fisici generali e del tratto genitale sono i principali fattori che contribuiscono alla disfunzione sessuale nelle donne. Depressione e ansia sono state riscontrate nel 17% - 69% dei pazienti e sono spesso correlate a dolore, affaticamento, disabilità e cambiamenti corporei [3].

1.1.6 Diagnosi

Le difficoltà inerenti alla diagnosi, allo screening e al trattamento della SSc sono dovute alla complessità della patogenesi della malattia, che comporta l'interazione tra il sistema immunitario, la vascolarizzazione e i componenti del tessuto connettivo. Pertanto, è importante una collaborazione interdisciplinare nello screening e nella diagnosi dei pazienti. Esistono diversi strumenti utilizzati nella pratica clinica, come anamnesi clinica ed esame fisico (RSS - punteggio cutaneo di Rodnan per misurare l'estensione della fibrosi cutanea), test di laboratorio (rilevazione di autoanticorpi come marker di malattia) ed esami strumentali (capillaroscopia ed esami specifici per coinvolgimento degli organi interni). In assenza di un test diagnostico che dimostri l'assenza o la presenza di SSc, sono stati sviluppati diversi set di criteri diagnostici con l'obiettivo anche di uniformare i criteri per i pazienti che entravano in trial clinici.

L'American College of Rheumatology (ACR) e la European League Against Rheumatism (EULAR) hanno stabilito un nuovo criterio di classificazione per SSc. Gli esperti hanno concluso che "l'ispessimento cutaneo delle dita di entrambe le mani che si estende prossimale alle articolazioni metacarpo-falangee" era sufficiente per classificare un soggetto con SSc. Inoltre, i pazienti con ispessimento cutaneo che risparmiano le dita sono classificati come non affetti da SSc. Il sistema di classificazione recentemente sviluppato comprende i quattro elementi dei criteri di classificazione ARA del 1980, nonché gli elementi della proposta del 2001 per la classificazione di SSc da parte di Leroy e Medsger [44].

La classificazione include 7 domini, alcuni domini hanno più manifestazioni possibili e ognuna ha un punteggio: ispessimento della pelle delle dita (*puffy finger*, sclerodattilia), lesioni della punta delle dita (ulcere digitali della punta, cicatrici digitali), telangiectasia, capillari alterati, ipertensione arteriosa polmonare e / o malattia polmonare interstiziale, fenomeno di Raynaud, presenza degli anticorpi correlati alla sclerodermia. Il punteggio massimo è 19 e la diagnosi di SSc viene posta se viene raggiunta la soglia di 9 o più punti.

Nella nuova classificazione è stato incluso il concetto dei autoanticorpi specifici come anti-centromero, anti-topoisomerasi I e anti-RNA polimerasi III. La sensibilità e la specificità dei nuovi criteri SSc erano 0,91 e 0,92 nel campione di validazione; il nuovo sistema è più inclusivo e funziona bene anche nei pazienti con malattia precoce, il che significa un periodo dall'insorgenza fino alla diagnosi di 0–3 anni [31].

La diagnosi è più difficoltosa nelle fasi precoci della malattia quando la sclerosi sistemica si può manifestare unicamente con il fenomeno di Raynaud. Uno dei problemi più rilevanti è infatti che lo stadio iniziale della SSc può essere indistinguibile dal fenomeno di Raynaud primitivo o dalla malattia indifferenziata del tessuto connettivo (UCTD).

In un recente esercizio di Delphi, quattro segni / sintomi sono stati identificati come necessari per la diagnosi precoce di SSc: fenomeno di Raynaud, dita gonfie che evolvono in sclerodattilia, anticorpi antinucleari e anticorpi specifici SSc (ACA e anti-topo I anticorpi) e anormale capillaroscopia con pattern sclerodermico [45].

1.1.7 Terapia

La gestione appropriata dei pazienti con SSc è complessa e include aspetti quali la diagnosi precoce del coinvolgimento di organi interni, l'identificazione di pazienti a rischio di progressione e trattamenti non farmacologici.

Ad oggi non esiste una terapia eziopatogenetica validata in grado di curare questa patologia. Essendo la sclerosi sistemica una malattia clinicamente molto eterogenea e con interessamento multi-organo, l'approccio migliore risulta essere un approccio

integrato, basato su una combinazione di farmaci che agiscano sui differenti aspetti della malattia. Esistono infatti numerosi trattamenti in grado di alleviare i sintomi e di rallentare la progressione del danno d'organo.

I singoli pazienti sclerodermici presentano un coinvolgimento d'organo variabile e di diversa intensità. Questo fa sì che il trattamento debba essere personalizzato, per ridurre al minimo i sintomi e per preservare il più possibile la funzionalità di ciascun organo.

I farmaci immunosoppressori: (anti-infiammatori non steroidei, corticosteroidi ad alte dosi, ciclofosfamide in combinazione con steroidi, ciclosporine) hanno una scarsa efficacia e il loro uso è razionalmente limitato alle forme di sclerodermia con una forte componente infiammatoria, per controllare i dolori muscolari e tendinei. La ciclofosfamide è l'unico farmaco modificante la malattia, poiché è approvato ed efficace per la SSc attiva con coinvolgimento polmonare [46].

Alcuni esempi di terapia specifica per organo sono: analoghi della prostaciclina, con azione vasoattiva, per il trattamento delle ulcere e dell'ipertensione polmonare; inibitori della pompa protonica e farmaci procinetici nei pazienti che sviluppano esofagite da reflusso; farmaci per controllare la pressione arteriosa, in particolare inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) e per prevenire un peggioramento della funzionalità renale.

Grazie ai progressi della ricerca negli ultimi anni sono state adottate nuove terapie sperimentali, contribuendo notevolmente a migliorare la qualità e l'aspettativa di vita dei pazienti con SSc. I farmaci attualmente in uso sono [21][47]:

- Inibitori della via infiammatoria: anti CD-20 (Rituximab), bloccanti del recettore IL-6 (Tocilizumab)
- Farmaci antifibrotici: inibitori della tirosina chinasi, Imatinib, Dasatinib, Nilotinib
- Antagonisti del recettore dell'endotelina - ENA (Bosentan, Sitaxentan, Ambrisentan)

Alcuni di questi farmaci, come il rituximab e l'imatinib, sono ora utilizzati in numerosi studi e con buoni risultati per i pazienti, aprendo nuove prospettive alla comprensione

della malattia. Grazie ai progressi fatti nella ricerca, negli ultimi anni sono state, inoltre, adottate nuove terapie sperimentali. Il razionale di queste terapie, risiede nell'assunto di poter silenziare quelle vie che sono patogenicamente attivate in corso di malattia. Purtroppo, la rarità della patologia e la sua eterogeneità non permettono agevolmente di provare la loro efficacia in trial clinici su ampia scala.

1.1.8 Prognosi

È stato dimostrato che la SSc è la connettivite con la più alta mortalità. Revisioni sistematiche di studi di coorte e meta-analisi hanno mostrato un rapporto di mortalità standardizzato di 2,3-3,5 nella SSc con una sopravvivenza cumulativa dalla diagnosi del 75-90% a 5 anni e del 62,5-84% a 10 anni. L'aspettativa di vita media dei pazienti con SSc è inferiore di 16-34 anni rispetto a quella della popolazione generale [3] [48].

Le principali cause di morte nei pazienti sclerodermici sono attualmente ILD (16,8%), PAH (14,7%), cancro (13,1%), cardiopatia (12,0%) e infezioni (9,1 %). L'11,9% dei pazienti con SSc soffrono di PAH, e l'incidenza annuale di questa grave complicanza è del 1,4% [49].

In media, i maschi muoiono in età più giovane e hanno una durata della malattia più breve rispetto alle femmine. I predittori indipendenti di mortalità sono: età avanzata, genere maschile, sottogruppo SSc forma diffusa, elevati reattivi in fase acuta, dispnea, presenza di ILD nell'imaging del torace, ridotta capacità di emissione di anidride carbonica, bassa capacità vitale forzata (FVC), proteinuria, crisi renale da sclerodermia, frazione di eiezione ventricolare sinistra depressa, ulcere digitali e coinvolgimento articolare [3].

1.2 Fattore di crescita derivato dalle piastrine e il suo recettore (PDGF/PDGFR)

La fibrosi si verifica in tutti gli organi e tessuti, diventa irreversibile con il tempo e determina ulteriormente la perdita della funzione dei tessuti coinvolti. Vari tipi di cellule iniziano e perpetuano la fibrosi mediante l'attivazione paracrina dei principali esecutori cellulari della fibrosi, cioè cellule mesenchimali stromali come fibroblasti, periciti e miofibroblasti. Molteplici vie sono coinvolte nella fibrosi e la segnalazione PDGF è uno dei mediatori centrali [50].

Il fattore di crescita derivato dalle piastrine è stato identificato come un fattore di crescita per fibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule gliali. Questa citochina svolge una funzione mitogena e chemiotattica per le cellule di origine mesenchimale e favorisce la produzione di collagene da parte dei fibroblasti [33][51]. *In vivo*, il PDGF ha ruoli importanti durante lo sviluppo embrionale e durante la guarigione delle ferite. Inoltre, la sua iperattività è stata implicata in diverse condizioni patologiche [52].

Il PDGF è secreto da vari tipi di cellule come piastrine, monociti e cellule endoteliali [53]. Nella cute partecipano alla produzione di PDGF i cheratinociti e le cellule di Langerhans, mentre nel polmone questo fattore è prodotto dalle cellule epiteliali e dai macrofagi alveolari [50].

Strutturalmente il PDGF è composto da un dimero di catene polipeptidiche legate da ponti disolfuro. Esistono 4 tipi di catene polipeptidiche: il PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, e PDGF-D, che possono formare sia omodimeri PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD che eterodimeri PDGF-AB.

Una disfunzione nei segnali del PDGF sembra essere implicata nell'aterosclerosi, nell'ipertensione polmonare e nella fibrosi d'organo (tra cui la fibrosi del fegato e rene). Nei soggetti sani sia il ligando che il recettore a livello vascolare sono quasi indosabili ma nelle patologie vascolari sono spesso iperespressi [52].

Il PDGF agisce andando ad attivare il suo recettore, inducendo un omo o eterodimerizzazione delle 2 isoforme di tirosin-chinasi, il PDGFR α e il PDGFR β , che una volta dimerizzate si autofosforilano nei domini intracitoplasmatici e in vari punti di questi si creano i siti di attacco per le diverse molecole coinvolte nella via di trasduzione

intracellulare del segnale [51][54]. Le risposte cellulari alla segnalazione PDGF includono proliferazione, sopravvivenza, migrazione e controllo della differenziazione. I recettori PDGF sono strettamente regolati da una conformazione allosterica autoinibitoria che determina un'attività basale molto bassa in assenza di ligando [51].

I recettori PDGF α e - β sono strutturalmente simili e attivano percorsi di trasduzione del segnale sovrapposti tra cui fosfatidilinositolo 3 chinasi, Ras-MAPK chinasi della famiglia Src e fosfolipasi C γ (PLC γ) con conseguente sovrapposizione di proprietà biologiche in vitro [55].

I due recettori differiscono nella loro affinità di legame nei confronti dei diversi ligandi: il PDGFR α lega le isoforme AA, BB, AB e CC del PDGF, mentre il PDGFR β lega le isoforme BB, DD e con minore affinità l'isoforma AB [51].

Esistono anche modalità indipendenti dal PDGF per attivare questi recettori. È stato osservato che il PDGFR α può essere stimolato da altri fattori di crescita non-PDGF, che prevede un'attivazione protratta della forma monomerica del recettore, che viene internalizzato e degradato molto più lentamente. L'attivazione PDGF-indipendente è stata scoperta nel contesto del distacco di retina sperimentale, la cui patogenesi dipende dall'attivazione prolungata di PDGFR α . VEGF consente l'attivazione indiretta di PDGFR α antagonizzando l'attivazione PDGF-dipendente di PDGFR; la rimozione di VEGF consente al PDGF di bloccare i non-PDGF, che sono responsabili dell'attivazione indiretta del PDGFR α e quindi della sopravvivenza delle cellule spostate nel vitreo [56].

Un altro modo di attivare i PDGFR dipende dagli anticorpi contro il PDGFR α presenti nel siero dei pazienti con sclerodermia e questi autoanticorpi attivano i recettori legandosi al loro dominio extracellulare. Il risultato è una maggiore espressione del collagene di tipo I e la conversione dei fibroblasti in miofibroblasti.

1.2.1 Ruolo del PDGF nella sclerodermia

Un'eccessiva attività del PDGF è stata associata a diverse patologie, tra cui l'aterosclerosi, l'ipertensione polmonare, la fibrosi degli organi e la tumorigenesi.

È stato dimostrato che PDGF svolge un ruolo importante nella patogenesi della SSc. Simile ad altri disturbi fibrotici, un passaggio patogeno potenzialmente rilevante nella SSc è la transdifferenziazione dei periciti e dei fibroblasti residenti locali in miofibroblasti profibrotici.

- PDGF e PDGFR sono sovraregolati nelle lesioni cutanee dei pazienti con sclerodermia e promuovono l'attivazione dei miofibroblasti [57][58].

- Topi transgenici per il recettore PDGFR α con guadagno di funzione, portano a un'iperplasia del tessuto mesenchimale. In alcuni modelli questa iperplasia è tanto importante da far morire già alla nascita questi topi [59].

- Gli studi sulle colture cellulari mostrano che il PDGF-C ha un forte effetto mitogenico e migratorio sui fibroblasti cutanei umani. Il PDGF-C prodotto dai macrofagi M2 induce l'espressione dell' α -SMA nei fibroblasti cutanei *in vitro* e potrebbe anche promuovere la differenziazione dei miofibroblasti nella fibrosi cutanea.

- Il silenziamento del PDGFR-A da parte del siRNA inibisce la transdifferenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti. Due studi indipendenti mostrano che i pazienti affetti da sclerodermia presentavano livelli significativamente elevati di PDGF-B circolante (8 volte e 2,5 volte, rispettivamente), che potrebbero svolgere un ruolo nella disfunzione vascolare sistemica e nei cambiamenti fibrotici [50].

- Livelli elevati di PDGF-A e PDGF-B sono stati trovati nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) ottenuto da pazienti con sclerodermia.

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

- Il signaling del PDGF sembra lavorare in sinergia con quello del TGF β nello sviluppo della fibrosi [60].

- A differenza dei normali fibroblasti quelli della sclerodermia rispondono al TGF β con una iperespressione del PDGFR α [61].

- È stato dimostrato che via PDGFR si assiste all'attivazione di ERK1/2 e alla produzione finale di ROS; sia i radicali che la chinasi contribuiscono vicendevolmente alla stabilizzazione della proteina Ras. Questo circuito, che nella SSc sembra automantenersi, conduce nei fibroblasti a eccessiva produzione di collagene di tipo I, danno al DNA e aumentata senescenza cellulare [62].
- L'infiammazione che si verifica soprattutto nelle prime fasi della sclerodermia, può aumentare l'espressione del PDGFR nei fibroblasti tramite aumento delle citochine [60].
- È anche ipotizzabile che il PDGF abbia un ruolo nella vasculopatia e nell'occlusione vascolare, in quanto nei periciti dei pazienti sclerodermici si trova una sovr'espressione del PDGFβ. È da notare che ciò avviene anche nei periciti dei vasi linfatici e che anche questi vanno incontro a rarefazione nella SSc [50].

1.2.2 Anticorpi contro il recettore del PDGF

Recenti studi hanno rilevato e isolato autoanticorpi stimolanti rivolti contro il recettore del PDGFα nel siero dei pazienti affetti da sclerodermia [52]. Questi anticorpi sono in grado di attivare una via intracellulare che coinvolge ERK1 / 2, NADPH ossidasi e Ras, stimolando la produzione di ROS e inducendo la trascrizione del gene del collagene (Figura 1).

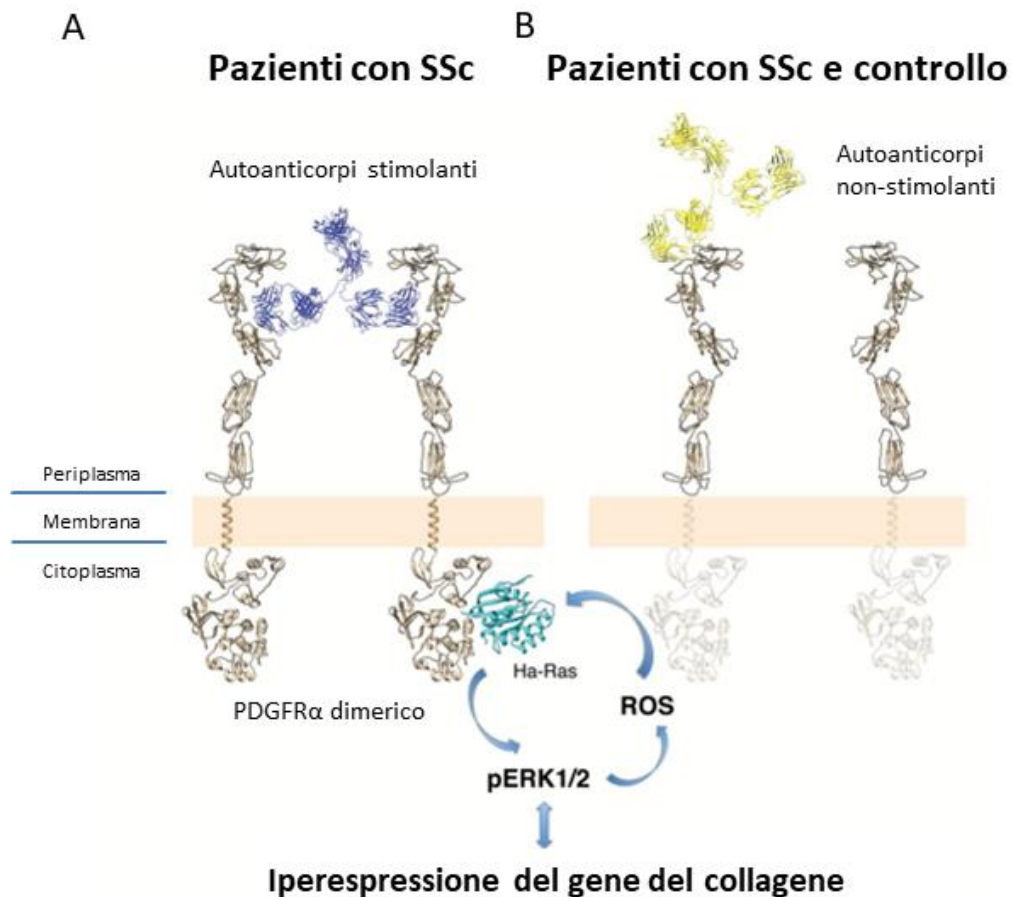


Figura 1: Differenza tra gli epitopi degli autoanticorpi anti-PDGFRα stimolanti e non-stimolanti. (A) L'autoanticorpo stimolante clonato dalle cellule B della memoria di un paziente con SSc lega un epitopo conformazionale discontinuo del dominio extracellulare del PDGFRα, determinando la dimerizzazione del recettore e la successiva attivazione di un circuito di segnalazione intracellulare che coinvolge Ha-Ras, fosfo-ERK e ROS, inducendo la sovraespressione del gene del collagene. Ciò evidenzia l'importanza di questa regione di PDGFRα come fattore scatenante della produzione di collagene nei fibroblasti e identifica possibili strategie per bloccare l'eccessiva produzione di collagene in condizioni patologiche come la SSc. (B): Autoanticorpo non stimolante clonato da cellule B di memoria dello stesso paziente affetto da SSc lega un singolo epitopo lineare al dominio extracellulare del PDGFRα, senza la successiva dimerizzazione del recettore. Questo tipo di autoanticorpo "innocente" può riflettere la cosiddetta autoimmunità naturale, che può essere trovata in molti individui sani e non ha alcun ruolo apparente nella patofisiologia né in malattia [63].

L'attivazione di questa cascata di segnale da parte di autoanticorpi specifici per PDGFR provoca infine uno stress ossidativo diffuso.

Ciò potrebbe portare i fibroblasti all'acquisizione di un fenotipo miofibroblastico che potrebbe spiegare una risposta profibrotica persistente con una successiva formazione di focolai di infiammazione e un'ulteriore diffusione della trasformazione fibrotica del tessuto connettivo [64].

Al fine di confermare la presenza di autoanticorpi anti-PDGFR stimolanti nella SSc, il repertorio immunitario di un paziente con SSc è stato studiato direttamente da Moroncini *et al.* [65].

Autoanticorpi monoclonali umani ricombinanti anti-PDGFR α

Per confermare il rilevamento dell'autoanticorpo, sono stati isolati i linfociti B memoria dal sangue periferico di un paziente da cui erano state isolate le immunoglobuline. Questi sono stati seminati mediante *Limiting dilution* in centinaia di piastre di coltura cellulare e il risultante di ciascun pozzetto è stato sottoposto a screening per la presenza di IgG anti-PDGFR α . Questa metodologia ha permesso l'identificazione di alcuni cloni di linfociti B che producevano anticorpi leganti il PDGFR α . In seguito, è stato estratto da queste stesse cellule l'RNA totale, retrotrascritto e amplificato per analizzare il repertorio genico delle IgG umane. Il cDNA delle catene pesanti e leggere identificate è stato clonato in un vettore di espressione e trasferito in cellule Ovariche di criceto cinese (CHO); l'espressione di IgG ricombinanti nei supernatanti di coltura è stata confermata dal saggio di immunoassorbimento enzimatico specifico per IgG (ELISA). Le colture cellulari sono state espanse nel bioreattore e il mab umano ricombinante secreto è stato purificato dai surnatanti [65].

Successivamente, utilizzando un biosensore ottico a risonanza, è stato caratterizzato il legame tra il PDGFR α bloccato in superficie e l'anticorpo monoclonale (mab) anti-PDGFR α umano prodotto dalle cellule SSc B, ed è stato rilevato e quantificato il livello di IgG autoimmune sierico con caratteristiche di legame simili ai mab [66].

Per identificare gli epitopi specifici del mab umano ricombinante per il PDGFR α , è stato utilizzato il molecular docking per predire le regioni di legame tra PDGFR α umano monomerico modellato in omologia e frammenti Fab mab umani ricombinanti o PDGF-BB umano monomerico. L'uso di una libreria peptidica conformazionale della porzione extracellulare del PDGFR α ha permesso il riconoscimento degli epitopi legati

da questi anticorpi. Mentre il VH_{PAM} - $V\lambda 13B8$ è risultato incapace sia di legare che di stimolare il PDGFR [67].

Esistono 3 epitopi distinti del PDGFR α riconosciuti da questi anticorpi (Figura 2):

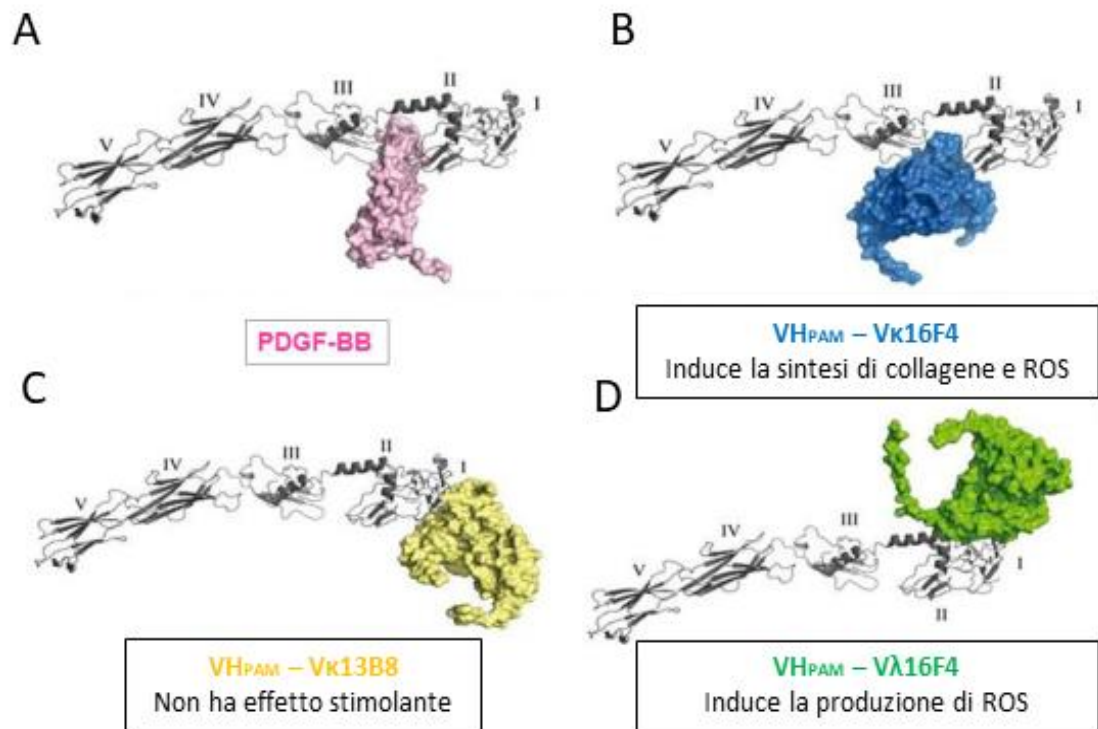


Figura 2: Mappatura degli epitopi del PDGFR umano. I modelli di docking molecolare mostrano il legame del PDGF-BB monomerico (A) o frammenti Fab del mab umano ricombinante $VH_{PAM} - V\kappa 16F4$ (B), $VH_{PAM} - V\kappa 13B8$ (C) e $VH_{PAM} - V\lambda 16F4$ (D) alla regione extracellulare del PDGFR α monomerico, che comprende i 5 domini simili a Ig (etichettati I – V dal terminale N al terminale C).

- Il VH_{PAM} - $V\kappa 16F4$ (un anticorpo monoclonale ricombinante umano agonista) si lega a un epitopo discontinuo all'interno del secondo e terzo dominio extracellulare del PDGFR α . L'anticorpo induce in vitro entrambi i geni: ROS e del collagene di tipo I.
- Il VH_{PAM} - $V\lambda 16F4$ (capace di legare il recettore e indurre la produzione di ROS), riconosce un epitopo compreso tra il primo e il secondo dominio extracellulare del PDGFR α umano, distinto da quello riconosciuto dal VH_{PAM} - $V\kappa 13B8$.

- Il VHPAM-Vκ13B8 (un anticorpo capace di legare il recettore ma privo di attività stimolatoria), riconosce una sequenza lineare amminoacidica nel primo dominio del PDGFRα. [66][67].

Attualmente è in corso di validazione un test di riconoscimento dei soli autoanticorpi agonisti basato sull'epitopo da loro legato, mentre è già presente un test ELISA atto a rilevare tutti gli anticorpi anti-PDGFR. Tramite quest'ultimo test possiamo osservare che in 66 su 70 pazienti con SSc vengono riscontrati anticorpi anti-PDGFRα (94,3%) e in 63 su 130 controlli sani (48,5%). Gli anticorpi sierici VHPAM-Vκ16F4 sono stati trovati in 24 su 34 pazienti con SSc, ma non in controlli sani.

È importante sottolineare che le IgG purificate dai campioni di siero dei pazienti con SSc positivi all'ELISA si sono dimostrati positivi anche in saggio biologico sui ROS, mentre le IgG purificate dai controlli sani positivi all'ELISA sono risultati negativi al test biologico. Ciò suggerisce che l'anti-PDGFRα non agonista può essere presente anche nei controlli sani, mentre gli anticorpi anti-PDGFRα agonista sono specifici per SSc [67].

Per dimostrare indirettamente un'attività in vivo di questi anticorpi si è attuato un trial clinico su pazienti con SSc non rispondenti a terapia. Si è somministrato loro 4 cicli di rituximab che ha migliorato la condizione clinica, si è poi valutata l'attività dei loro anticorpi nello stimolare la produzione di ROS e collagene di tipo I in vitro su cellule provenienti da biopsie cutanee. In questo studio si è potuto osservare che anche l'attività degli anticorpi era diminuita, rafforzando l'ipotesi di un ruolo importante dei linfociti B e degli anticorpi agonisti nello sviluppo della patologia [68].

È stata poi ottenuta un'evidenza diretta tramite un modello murino con trapianto di cute umana bioingegnerizzata. Più precisamente si sono ottenuti cheratinociti e fibroblasti da biopsie di cuti di pazienti sani, si è poi ricostruita una cute tridimensionale bioingegnerizzata e si è trapiantata sul dorso di topi SCID. La cute trapiantata è stata poi sottoposta alle iniezioni di IgG totali dei pazienti con SSc e con anticorpo monoclonale agonista del PDGFR ponendo come controllo le IgG dei pazienti sani. Solo con le IgG dei soggetti malati o con gli anticorpi monoclonali si osserva l'aumento del collagene e l'attivazione dei fibroblasti [69].

I fibroblasti non sono l'unico target degli anticorpi anti-PDGFR α agonisti. Questo è stato recentemente dimostrato sulle cellule muscolari lisce dell'arteria polmonare umana (HPASMC) che sono state esposte all'autoanticorpo monoclonale anti-PDGFR α VH_{PAM}-Vk16F4 e all'anticorpo VH_{PAM}-Vk13B8. HPASMC ha acquisito un fenotipo sintetico caratterizzato da un più alto tasso di crescita, attività migratoria, espressione genica della catena α 1 del collagene di tipo I quando stimolato con PDGF e autoanticorpi contro il recettore PDGF, ma non con IgG normale. Gli autoanticorpi agiscono tramite l'aumento dell'espressione del gene NOX4 codificante per la NADPH ossidasi-4 [70].

È lecito quindi ipotizzare un ruolo patogenetico anche nel danno vascolare della SSC e nella grave complicanza dell'ipertensione arteriosa polmonare [29][70].

1.3 Modelli sperimentali animali di SSc

I modelli animali forniscono sia una base sulla quale fare sperimentazione farmacologica, sia uno spunto per studiare o confermare i ruoli dei vari pathway nella patogenesi delle patologie, per questa ragione sono stati sviluppati negli anni diversi modelli. Attualmente per la sclerodermia possiamo identificare 2 gruppi: il gruppo dei modelli inducibili e quello dei modelli spontanei.

I modelli inducibili sono quelli in cui la malattia è indotta da immunizzazione, trasferimento di componenti autoimmuni oppure indotta da fattori ambientali (Tabella 1). Tra questi distinguiamo in particolare alcuni modelli tra cui:

- Modello murino basato sul trattamento con la bleomicina. La bleomicina è un antibiotico chemioterapico e il suo uso in modelli animali di fibrosi si basa sul fatto che la fibrosi è uno dei principali effetti avversi della bleomicina. A seconda della via di somministrazione e della dose somministrata, la bleomicina può indurre diversi pattern fibrotici: fibrosi bronchiale, cicatrici sub-pleuriche, fibrosi cutanea localizzata o anche fibrosi polmonare [71][72].
- Modelli basati sulla somministrazione di specie reattive dell'ossigeno. Un modello descritto di recente è indotto dall'iniezione intradermica giornaliera di acido ipocloroso (HOCl), che causando la generazione di radicali porta ad una maggiore sintesi di collagene nella cute e nel tessuto polmonare e determina la formazione dei anticorpi anti-DNA topoisomerasi 1.
- Modello murino di malattia da rigetto (GvHD) cronica. Modelli di topi trapiantati con incompatibilità degli antigeni minori di istocompatibilità sviluppano nella maggior parte dei casi un fenotipo simil-sclerodermico in cui è presente fibrosi cutanea, polmonare e intestinale.
- Modelli di fibrosi mediati da TGF- β . Poiché il TGF- β è un mediatore profibrotico, l'incubazione di fibroblasti normali con il TGF- β induce un fenotipo profibrotico simil-sclerodermico. I modelli murini con alterazioni di questo mediatore, mostrano grave fibrosi cutanea e anomalie in più organi [72].

- Topi immunizzati contro la DNA topoisomerasi 1. Gli autoanticorpi diretti contro la DNA topoisomerasi I (Topo I) fanno parte degli esami per la diagnosi della SSc e inoltre correlano con la gravità della malattia. Immunizzando i topi con la DNA topoisomerasi 1 ricombinante umana, Yoshizaki e colleghi hanno sviluppato negli animali fibrosi tissutale nella pelle e nel polmone, infiltrazione infiammatoria e apoptosi epiteliale alveolare [73].
- Topi con trapianto di cute bioingegnerizzata. Per la realizzazione di questo modello sono stati isolati cheratinociti e fibroblasti da biopsie cutanee di soggetti sani e affetti da SSc per la creazione di cute bioingegnerizzata. Successivamente questa è stata innestata sul dorso di topi SCID. La cute ricostruita dalle cellule di pazienti sclerodermici manifesta un fenotipo sclerodermico per 24 settimane. In questo periodo nei fibroblasti della cute bioingegnerizzata si nota un aumento della produzione dei ROS e dell'espressione del gene COL1A2, caratteristiche riscontrabili anche nei pazienti affetti da SSc. Nei modelli murini in cui è stata trapiantata la cute bioingegnerizzata derivata dalle cellule dei pazienti sani sono stati somministrati gli autoanticorpi monoclonali anti-PDGFR generati da cellule B di pazienti con SSc per dimostrare che in vivo la fibrosi cutanea indotta dalle IgG si ha attraverso la via di attivazione del PDGFR. I risultati hanno mostrato che in questo modo si ha l'induzione nella cute sana trapiantata di un fenotipo sclerodermico con accumulo di collagene, aumento dell'attività dei fibroblasti e vasculopatia [69].

Modello	Autoanticorpi sierici	Sede infiammazione	Vasculopatia	Sede fibrosi
Topi trattati con bleomicina	ANA	cute, polmoni	cute	cute, polmoni
Modello basato sulla GVHD	ANA	cute	-	cute, polmoni
Topi trattati con HOCl	ATA, ACA	cute, polmoni, reni	reni	cute, polmoni, reni
Modello indotto da angiotensina 2	-	cute	-	cute
Topi immunizzati contro la Topoisomerasi-1	ATA	cute, polmoni	-	cute, polmoni
Topo con trapianto di cute bioingegnerizzata	-	-	cute	-

Tabella 1: Riassunto delle manifestazioni patologiche degli attuali modelli murini di SSc inducibili.

Nel secondo gruppo di modelli sperimentali animali di SSc rientrano tutti i modelli spontanei, in cui i topi sviluppano malattie dovute a mutazioni o modificazioni genetiche senza ulteriori manipolazioni sperimentali (Tabella 2). Tra questi troviamo:

- Topi con deficit di Friend leukemia virus integration 1 (Fli-1), un membro della famiglia dei fattori di trascrizione di Ets. È stato dimostrato che Fli-1 agisce come un potente repressore del gene del collagene di tipo 1 e quindi regola la fibrogenesi. Il

livello di Fli-1 è costitutivamente soppresso nei fibroblasti dermici, nelle cellule endoteliali dermiche microvascolari e nei cheratinociti dei pazienti con SSc (a causa della ipermetilazione del gene nel DNA), suggerendo che Fli-1 potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi della SSc.

I topi con delezione omozigote del dominio di attivazione trascrizionale C-terminale del gene Fli-1 sono vitali e sviluppano una fibrosi prominente della cute. Sopprimendo anche il gene Klf-5 (un secondo fattore di trascrizione trovato soppresso in pazienti con sclerosi sistemica) questi topi sviluppano spontaneamente tre segni distintivi di SSc, tra cui autoimmunità, vasculopatia e fibrosi tissutale. Per esplorare meglio il ruolo di Fli-1, sono stati generati e studiati topi knockout per il gene Fli-1 specifici per alcune linee cellulari [73].

- Topi con deficit di uPAR. Il recettore per l'attivatore di tipo urochinasi del plasminogeno (uPAR) è un componente chiave del sistema fibrinolitico coinvolto nel rimodellamento della matrice extracellulare e nell'angiogenesi. È stato osservato che pazienti con SSc con disturbi vascolari ed eccessiva produzione di matrice extracellulare avevano una diminuzione di uPAR. Si sono quindi sviluppati topi con deficit di uPAR e si è osservato che questi sviluppano aumento di miofibroblasti, innalzamento di citochine profibrotiche, infiltrati perivascolari e apoptosi delle cellule endoteliali [74][75].

- Topi Knockout per SIRT 3. La sirtuina 3 (SIRT3) è una deacetilasi localizzata nei mitocondri che occupa un ruolo centrale nel gruppo dei regolatori molecolari dei processi dell'invecchiamento. Dosando l'espressione di SIRT3 nella pelle e nei polmoni dei pazienti con SSc è stato dimostrato che questa è ridotta. È stato quindi realizzato un modello murino Knockout per SIRT 3 e di conseguenza questi topi sviluppano fibrosi del polmone, cuore e rene.

- Topi con iperespressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). VEGF è una potente molecola proangiogenica. Nei sieri e nelle biopsie cutanee dei pazienti con SSc i livelli di VEGF sono fortemente aumentati. Topi transgenici con sovraespressione di VEGF, sviluppano spontaneamente una significativa fibrosi cutanea e una vasculopatia proliferativa. Inoltre, dati derivati da esperimenti in vitro suggeriscono che VEGF agisce anche come una molecola profibrotica.

- Topi Knockout per il gene PTEN (Phosphatase and tensin homolog). PTEN è una fosfatasi lipidica e proteica, fa parte dei geni oncosoppressori. Nei pazienti con SSc vi è una ridotta espressione di PTEN. In questi modelli si sviluppa la fibrosi nella pelle e polmone anche in assenza di stimoli nocivi [73].
- Topi Tight-skin 1 (Tsk-1) e Tight-skin 2 (Tsk-2). Il topo tight-skin-1 (Tsk-1) è un modello basato su una duplicazione parziale in tandem del gene Fbn1 codificante per la fibrillina-1. Il ceppo di topo Tsk-2 è basato sulla mutazione del gene alfa1 del collagene 3 (Col31a) presente sul cromosoma 1. Questi ceppi, originariamente identificati aventi queste mutazioni spontanee, mostrano una pelle ampiamente ispessita che si sviluppa durante la prima settimana postnatale e successivamente una patologia polmonare.
- Topi transgenici per Fra2 (Fos-related-antigen 2). Fra2 è un membro della famiglia di fattori di trascrizione AP-1 ed è sovraespresso nella pelle e nei polmoni dei pazienti con SSc. I topi con sovraespressione transgenica di Fra2 ricalcano le principali manifestazioni vascolari e fibrotiche della SSc [76].
- Topi con deficit di Caveolina-1 (cav-1). La perdita di cav1, il gene che codifica per la caveolina-1, promuove l'internalizzazione clatrina-dipendente dei recettori del TGF- β , portando alla fosforilazione di Smad2/3 e all'attivazione costitutiva della segnalazione canonica TGF- β . Topi con carenza di Cav-1 mostrano alterazioni sia vascolari che fibrotiche tra cui la fibrosi polmonare e cutanea, la cardiomiopatia e l'ipertensione polmonare.
- Pollo UCD200. Esistono anche modelli non murini di SSc, tra questi il pollo UCD200 è il più completo. Questo modello si presenta con fibrosi cutanea e vasculopatia che si manifesta anche tramite il fenomeno di Raynaud.
- Modello murino di iperespressione transgenica specifica nel fibroblasto del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF). A seconda del tipo di cellula, il CTGF ha funzioni biologiche chiave che vanno dalla regolazione della crescita cellulare al rimodellamento tissutale. Il CTGF è un gene bersaglio comune del TGF- β e media in parte gli effetti pro-fibrotici del TGF- β . Questo modello di topo transgenico mostra fibrosi della pelle e degli organi interni, compreso il polmone [77].

- Topi transgenici per Wnt-10b. È noto che la via di segnalazione Wnt abbia un ruolo pro-fibrotico nella patogenesi della SSc. Recentemente è stato descritto un nuovo modello di fibrosi che deriva dalla sovraespressione transgenica di Wnt10b sotto il controllo del promotore degli adipociti Fabp4. I topi Wnt10b-transgenici presentano una significativa fibrosi dermica con perdita di tessuto adiposo [78].

Modello	Autoanticorpi sierici	Sede infiammazione	Vasculopatia	Sede fibrosi
TigTsk/+	ATA, ANA, anti- DNA	cute	-	cute
Tsk2/+	ATA, ANA, ACA, anti- DNA	cute	-	cute
Topi transgenici per Fra2	-	cute, polmoni, cuore	cute, polmoni, cuore	cute, polmone, cuore
Topi transgenici per Wnt-10b	-	polmone	-	cute
Topi con deficit di caveolina 1	-	polmone	-	cute, polmoni
Topi Fli-1 KO	-	-	-	cute
Topi Fli1+/- Klf5+/-	ANA	polmone	cute, polmoni	cute, polmoni

Topi Fli-1 KO nelle cellule endoteliali	-	-	Cute	-
Topi Fli-1 KO negli epiteliociti	ANA	cute, polmone	-	cute, polmoni, esofago
Topi uPAR KO	-	cute, polmone	cute, cuore	cute, polmoni, cuore
Topi SIRT3 KO	-	-	polmoni	polmoni, cuore, reni, fegato
Topi con iperespression e di VEGF	-	-	Cute	cute

Tabella 2: Riassunto delle manifestazioni patologiche degli attuali modelli murini di SSc spontanei.

1.3.1 Un nuovo modello murino umanizzato di SSc

In letteratura sono stati descritti numerosi modelli per lo studio della sclerosi sistemica [76], però è ancora molto sentita l'esigenza di crearne di nuovi, in quanto nessuno dei modelli sviluppati fino ad ora è in grado di ricapitolare tutte le caratteristiche della patologia umana.

La scoperta della presenza nel siero di pazienti affetti da sclerosi sistemica di diversi tipi di autoanticorpi coinvolti in diversi aspetti della patogenesi della malattia ha portato all'identificazione dei bersagli della risposta autoimmune in corso di sclerosi sistemica [52]. Tra questi è stato recentemente identificato il recettore del PDGF (PDGFR); è stato, infatti, dimostrato che anticorpi monoclonali umani anti-PDGFR α clonati dai

linfociti B memoria dei pazienti sono in grado di indurre un aumento della trascrizione dei geni del collagene sia *in vitro* su fibroblasti di pazienti sani, sia *in vivo* su porzioni di cute umana bioingegnerizzata trapiantate sulla schiena di topi SCID [69][70].

I meccanismi patogenetici attraverso i quali tali autoanticorpi contribuiscono alla fibrosi tipica della malattia meritano quindi di essere ulteriormente esplorati e caratterizzati *in vivo*. In una fase precedente di questo lavoro è stato pertanto generato un nuovo modello murino di sclerodermia attraverso I) la generazione di un topo caratterizzato da espressione ubiquitaria del PDGFR α umano, e II) l'induzione della fibrosi cutanea in questo nuovo modello animale mediante l'inoculo intradermico di anticorpi anti-PDGFR α umano.

A tale scopo è stato disegnato uno specifico vettore di targeting in grado di veicolare l'espressione ubiquitaria del PDGFR α umano, sotto il controllo del promotore forte CAG, nel locus murino Rosa26, senza influire in alcun modo sull'espressione del recettore endogeno. Cellule staminali embrionali appartenenti al ceppo C57BL/6 sono state utilizzate per il knock-in. I cloni di cellule staminali embrionali correttamente transfettati sono stati confermati tramite Southern Blotting, quindi selezionati per la microiniezione in blastocisti di topi C57BL/6, con conseguente produzione di animali chimerici. Essi sono stati quindi incrociati tra loro per selezionare una progenie caratterizzata dall'espressione del PDGFR α umano in tutti i tessuti murini. I topi ottenuti (F1) sono stati poi incrociati con topi Cre deleter. Si è ottenuto in questo modo un maschio e due femmine C57BL/6-hPDGFR α eterozigoti appartenenti alla generazione F2 che, incrociati tra loro, hanno permesso di generare la nuova colonia transgenica.

I topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α sono risultati sani, fertili e non hanno rivelato alcuna apparente anomalia dello sviluppo o caratteristica patologica. Tutti gli animali hanno raggiunto dimensioni e peso normali e non hanno mostrato alcun cambiamento nella morfologia rispetto ai topi wild type C57BL/6 [55].

Per valutare la trasmissione del transgene alla progenie murina tutti i topi sono stati sottoposti a genotipizzazione mediante PCR. Il gene del PDGFR α umano è stato stabilmente ereditato attraverso le diverse generazioni di topi, con un tasso di trasmissione alla progenie di circa il 50%. Inoltre, al fine di confermare l'effettiva

espressione del transgene nei tessuti murini, il numero di copie del PDGFR α umano è stata valutata mediante real-time PCR quantitativa nell'mRNA ottenuto da biopsie di cute.

I dati hanno dimostrato livelli di espressione del PDGFR α umano simili in tutti i campioni analizzati, con un range di rilevamento massimo di due ordini di grandezza, da 10^3 a 10^5 copie per campione [79]. In parallelo, livelli simili di proteina sono stati rilevati mediante Western blotting nei lisati cutanei.

Il nuovo modello murino di sclerodermia ottenuto si è poi dimostrato pronò alla fibrosi.

Infatti, l'iniezione intradermica, al giorno 0, 3, 6 e 9, di anticorpo monoclonale (mab) stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 16F4 o di IgG sclerodermiche (SSc IgG) nella cute del dorso di topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α ha indotto una significativa fibrosi cutanea, caratterizzata da un marcato ispessimento cutaneo ed un'aumentata deposizione di fibre collagene nel derma, densamente impacchettate e disposte in modo irregolare. Inoltre, è stata osservata una riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo che viene parzialmente sostituito dall'infiltrazione di fibre collagene [1][80]. Viceversa, l'iniezione intradermica sia di mab non-stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 13B8 sia di IgG purificate dal siero di controlli sani non hanno prodotto alcun cambiamento nella cute. Topi wild type C57BL/6 trattati con gli stessi reagenti hanno mostrato un'istologia cutanea normale.

2. Scopo della ricerca

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia autoimmune cronica devastante associata a un forte impatto sulla qualità e sulle aspettative della vita dei pazienti. Le principali cause di morte nei pazienti sclerodermici sono attualmente la fibrosi polmonare, l'ipertensione polmonare, il cancro e la cardiopatia associata.

La SSc è una malattia del tessuto connettivo priva di un trattamento patofisiologico e finora, sfortunatamente, nessuna strategia terapeutica è in grado di curare totalmente la malattia; ci sono solo terapie che possono limitare il coinvolgimento specifico degli organi, ma il loro effetto benefico sembra essere di breve durata e associato a significativi effetti collaterali.

L'identificazione, nel siero di pazienti con sclerodermia, di autoanticorpi agonisti diretti contro il PDGFR α e coinvolti nell'induzione della fibrosi, permette di esplorare nuovi approcci terapeutici per questa malattia.

Il nuovo modello sperimentale di sclerodermia indotta mediante iniezione intradermica di autoanticorpi monoclonali umani anti-PDGFR α in topi geneticamente modificati C57BL/6-hPDGFR α si è rivelato uno strumento utile ed efficace per approfondire la comprensione del ruolo degli anticorpi anti-PDGFR α umano nello sviluppo della fibrosi del derma.

Tuttavia, la cute non è l'unico organo bersaglio in corso di malattia. Lo scopo di questa ricerca è di esplorare vie di somministrazione alternative degli anticorpi, per riuscire ad indurre nel topo la fibrosi anche di altri organi target, quali ad esempio i polmoni, per ottenere un modello più accurato di sclerodermia che possa riprodurre gli aspetti sistemici della malattia.

3. *Materiali e Metodi*

3.1 Allevamento e cura degli animali

In questo studio sono stati utilizzati topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α eterozigoti di età compresa tra dodici e sedici settimane. Sono stati impiegati solo i topi maschi, date le notevoli differenze di genere descritte in letteratura nell'estensione e nella gravità della fibrosi tissutale [67][81][82].

I topi sono stati alloggiati 6 per gabbia, in condizioni *pathogen-free*, presso il Servizio di Allevamento e Sperimentazione Animale INRCA, Ancona, sono stati mantenuti in condizioni di temperatura e umidità costanti ed esposti a cicli luce/buio di 12 ore, con acqua e mangime *ad libitum* [83]. Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dal Ministero della Salute ed eseguite nel rispetto delle convenzioni della Dichiarazione di Helsinki. Sono stati fatti tutti gli sforzi possibili per ridurre al minimo la sofferenza degli animali [71].

3.2 Somministrazione endovenosa (EV) di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano: Dose finding

Al giorno 0 (figura A) i topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α sono stati sottoposti ad una singola iniezione endovenosa, attraverso la vena della coda (figura B), con 10 ug, 25 ug o 50 ug di anticorpo monoclonale (mab) stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 16F4 oppure di mab non stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 13B8 [65][69]. Topi controllo sono stati sottoposti ad iniezione endovenosa di soluzione fisiologica. L'esito positivo dell'iniezione è stato confermato dal passaggio del liquido senza resistenza nella vena e dalla mancanza di extravasazione.

Gli animali sono stati sacrificati dopo 14 giorni dalla somministrazione endovenosa mediante eccesso di anestetico (Figura 3)

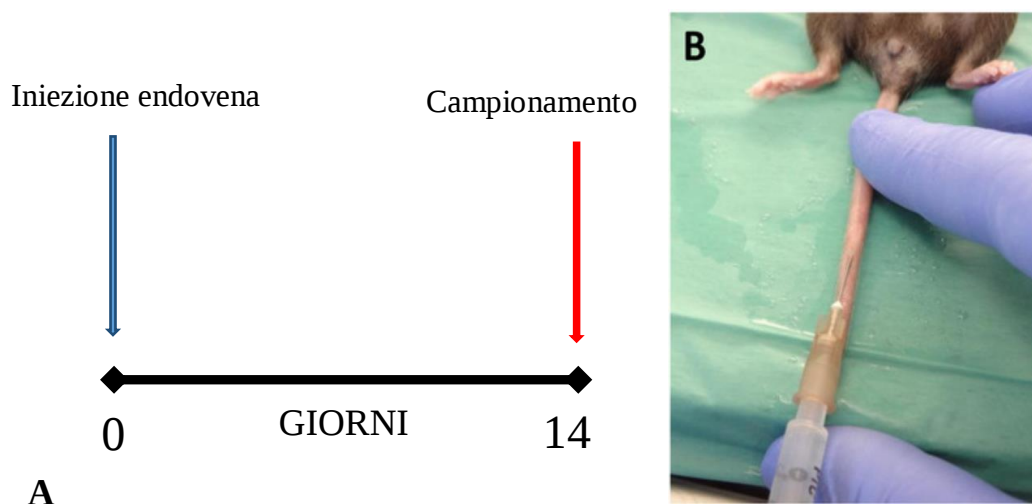


Figure 3: *A: Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale utilizzato per il dose finding. B: Immagine rappresentativa della somministrazione endovenosa attraverso la vena della coda.*

3.3 Doppia somministrazione endovenosa (EV) di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano

I topi sono stati sottoposti ad una doppia iniezione endovenosa, al giorno 0 e al giorno 7 (Figura 4), con 50 ug di anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-Vk16F4 oppure con un'ugual dose di mab anti-PDGFR α umano non stimolante VH_{PAM}-Vk13B8 oppure con soluzione fisiologica.

Gli animali sono stati sacrificati al giorno 21, ovvero 14 giorni dopo l'ultima somministrazione endovenosa, eccesso di anestetico.



Figura 4: *Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale utilizzato per la doppia somministrazione endovenosa (EV) di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano*

3.4 Monitoraggio degli animali e campionamento

Per ridurre al minimo la sofferenza degli animali, le iniezioni endovenose sono state eseguite in anestesia generale attraverso l'applicazione di una maschera facciale con un flusso continuo di isoflurano all'1,5%; i topi sono stati inoltre adagiati su tappetini riscaldanti per mantenere una temperatura stabile di 37 °C durante tutto l'esperimento [71]. Inoltre, dopo ogni trattamento, i topi sono stati osservati due volte al giorno, per monitorare il loro stato di salute e rilevare precocemente qualsiasi segno di sofferenza o aspetto patologico.

Dopo il sacrificio agli animali sono stati prelevati sangue, cute e polmoni. Le biopsie cutanee sono state effettuate in quattro aree diverse a livello del dorso; parte di esse è stata immediatamente congelata in azoto liquido e conservata a -80 °C per le successive analisi molecolari, mentre altre sono state fissate in formalina e incluse in paraffina. I polmoni sono stati asportati e immediatamente lavati con PBS freddo. I lobi del polmone destro sono stati congelati immediatamente in azoto liquido e conservati a -80 °C per le analisi di biologia molecolare. I lobi del polmone sinistro sono stati invece insufflati con formalina e, dopo 24 ore, inclusi in paraffina.

3.5 Analisi istologiche

I tessuti inclusi in paraffina sono stati tagliati in sezioni seriali di 5 μm di spessore ciascuna, quindi le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E) (Bio-Optica, Milano, Italia) e con Picrosirius Red (PSR) (Bio-Optica, Milano, Italia). Le sezioni di tessuto sono state osservate con un microscopio ottico E800 Nikon Eclipse e le immagini digitali sono state acquisite con una fotocamera Nikon DXM 1220. Lo spessore della cute è stato calcolato misurando la distanza (in μm), ad un ingrandimento 10x, tra la giunzione epidermide-derma e la giunzione derma-tessuto adiposo sottocutaneo in cinque campi per ciascuna delle sezioni colorata con H&E [75]. Inoltre, la densità delle aree positive alla colorazione con Picrosirius Red è stata misurata in cinque campi per ciascuna sezione utilizzando il software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). La densità media per ciascun campione è stata espressa in percentuale rispetto a quella misurata nei topi controllo trattati con soluzione fisiologica e i valori ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi statistica. Le misurazioni sono state eseguite in cieco da due osservatori indipendenti.

3.6 Determinazione dell'espressione del gene del collagene nei tessuti murini

I campioni di tessuto sono stati omogenati in TRI Reagent (Sigma-Aldrich) e l'RNA totale è stato estratto mediante protocollo manuale. L'RNA è stato quindi retrotrascritto in cDNA come precedentemente descritto [65]. L'espressione genica del collagene murino è stata valutata utilizzando i seguenti primers: CollA1 forward, 5'-ACATGTTACAGTTTGTGGACC-3'; CollA1 reverse, 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3'; Cyclophilin forward, 5'-GTGTTCTTCGACATCACGGC-3'; Cyclophilin reverse, 5'-GTGTTCTTCGACATCACGGC-3'; 18S rRNA forward, 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3'; 18S rRNA reverse, 5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3'; GAPDH umano/murino forward, 5'-CAGCGACACCCACTCCTCCAC CTT-3'; GAPDH umano/murino reverse, 5'-CATGAGGTCCACCACCCTG TTGCT-3'.

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

400 nM di primer. Sono stati impostati i seguenti parametri: denaturazione a 95 ° C per 15 secondi e annealing 60 ° C per 1 minuto, per 40 cicli. Dopo aver normalizzato i dati ottenuti utilizzando i geni housekeeping GAPDH, ciclofilina e rRNA 18S, l'espressione genica relativa ai topi controllo trattati con soluzione fisiologica è stata calcolata con il metodo $\Delta\Delta C_t$.

3.7 Quantificazione dell'espressione del PDGFR α umano e murino nei tessuti di topo

L'espressione del PDGFR α umano e murino nei tessuti del topo è stata misurata mediante real-time PCR quantitativa. Biopsie di tessuto congelate sono state omogenizzate meccanicamente in TRI Reagent (Sigma-Aldrich), utilizzando il gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec), e l'RNA totale è stato estratto seguendo le indicazioni del produttore. L'RNA (1 μ g) è stato retrotrascritto in cDNA mediante l'iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Il cDNA è stato quindi amplificato mediante primer e sonde specifici: PDGFR α murino forward, 5'-GACTTCCTAAAGAGTGACCATCC-3'; PDGFR α murino reverse, 5'-CTTCCCAGTCCTTCAGCTTATC-3'; sonda PDGFR α murino, 5'-ATGCGGGTGGACTCTGATAATGCG-3'; PDGFR α umano forward, 5'-ACAACCACACTCAGACAGAAG-3'; PDGFR α umano reverse, 5'-AGAATGAGCTTGAAGGCAGGCACA-3'; sonda PDGFR α umano, 5'-CGTCATTCTAGAGGTACAAAGG-3'.

Per quantificare l'espressione del recettore umano e murino è stata creata una curva standard, utilizzando specifici gBlocks (IDT Integrated DNA Technologies), ovvero frammenti di DNA specifici per il PDGFR α umano e murino [79], che sono stati diluiti da 10^7 a 10^2 copie. Il numero di copie degli gBlocks è stato calcolato in base alla seguente equazione [84]: (#bp in gBlocks) x 617,5 g/mol/bp x (1 mol/6,02x 10^{23} molecole) = peso per copia. Le reazioni sono state eseguite in triplicato per ciascun campione, utilizzando la TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) secondo le indicazioni del produttore, e impostando i seguenti cicli: 50 ° C per 2 minuti, 95 ° C per 10 minuti, poi 95 ° C per 15 secondi e 60 ° C per 1 minuto per 45 cicli.

3.8 Titolazione di anticorpi murini diretti contro gli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano inoculati.

Il metodo ELISA è stato utilizzato per la titolazione nel siero dei topi di anticorpi murini diretti specificamente contro gli anticorpi monoclonali umani anti-PDGFR α inoculati negli animali come precedentemente descritto [85]. Il siero è stato ottenuto dal sangue prelevato al giorno 0 e al giorno 7 dal seno retro-orbitale, oppure al momento del sacrificio degli animali mediante puntura cardiaca.

Per il saggio ELISA sul siero è stato inizialmente effettuato il coating della micropiastra da 96 well con 1 mg/mL di anticorpo monoclonale diluito in PBS incubando la piastra overnight a 4°C. Il giorno successivo, dopo passaggi con soluzione di lavaggio, i pozzetti sono stati incubati con una soluzione di blocco a temperatura ambiente per 1h in agitazione. Al termine, dopo opportuni lavaggi, i pozzetti sono stati incubati con 50 μ l di siero murino correttamente diluito lasciando la piastra a temperatura ambiente per 2 ore in agitazione. Dopo l'incubazione, la piastra è stata lavata con soluzione di lavaggio ed sono stati aggiunti in ogni pozzetto 100 μ l di anticorpo secondario diluito 1:4000 lasciando 1 ora in agitazione. Al termine, dopo opportuni lavaggi, nei pozzetti sono stati aggiunti 100 μ l di tetrametilbenzidine come substrato di reazione incubando 5 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata con 100 μ l di soluzione di stop ed immediatamente letta mediante un lettore di piastra ad una lunghezza di 450 e 600 nm al fine di calcolare la densità ottica. Il titolo anticorpale è stato calcolato sottraendo al valore di densità ottica di ogni campione, il valore di background dato dalla piastra stessa [86].

3.9 Analisi statistica

Tutti i dati quantitativi sono stati espressi come media $\pm$ SEM. I dati sono stati analizzati utilizzando il test di Mann-Whitney per valori non parametrici, il t test di Student a due code per valori parametrici e il test ANOVA ad una via per confrontare più di due gruppi. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 5 (California, USA). Valori di probabilità inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi.

4. Risultati

4.1 Induzione di fibrosi cutanea e polmonare mediante singola iniezione endovenosa di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano

Nella prima fase di questo lavoro i topi sono stati sottoposti ad una singola iniezione endovenosa, attraverso la vena della coda, con 3 dosi diverse di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano in modo da determinare quale fosse in grado di indurre la fibrosi.

L'analisi istologica di biopsie di cute prelevate al giorno 14 e colorate con Picrosirius Red ha documentato nei topi trattati con l'anticorpo monoclonale (mab) stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 16F4, in confronto alla fisiologica, un sensibile ispessimento cutaneo ed un'aumentata deposizione di fibre collagene nel derma, densamente impacchettate e disposte in modo irregolare (Figura 5). Inoltre, abbiamo osservato una riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo che viene parzialmente sostituito dall'infiltrazione di fibre collagene. È stato individuato che l'entità della fibrosi cutanea indotta incrementa progressivamente all'aumentare della dose di anticorpo somministrata.

Viceversa, l'iniezione endovenosa di mab non-stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 13B8 non ha prodotto alcun cambiamento nella cute che presenta un aspetto morfologico normale.

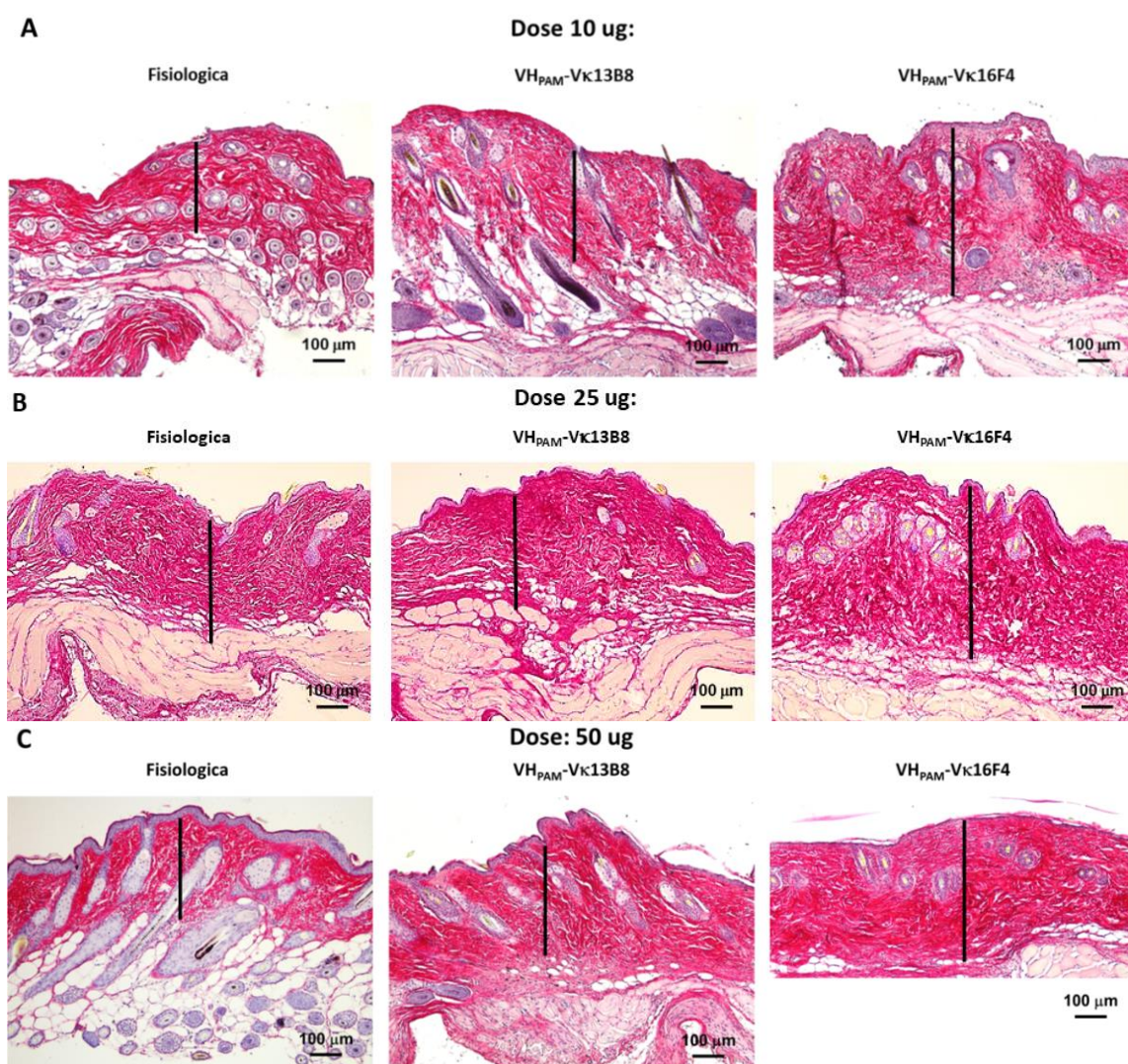


Figura 5: *Sezioni istologiche di cute del dorso prelevate al giorno 14 da topi C57BL/6-hPDGFR α dopo iniezione endovena di soluzione fisiologica, anticorpo monoclonale anti-PDGFR α umano non stimolante VH_{PAM}-V κ 13B8, e di anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 16F4 in dose di (A) 10 ug, (B) 25 ug e (C) 50 ug. Le sezioni istologiche sono state colorate con Picrosirius Red. Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.*

La somministrazione endovenosa di mab VH_{PAM}-V κ 16F4 in 3 dosi diverse ha determinato persino un'alterazione a livello polmonare, oltre che cutanea.

L'esame istologico dei tessuti polmonari prelevati al giorno 14 ha infatti evidenziato, in confronto alla fisiologica, un danno polmonare in fase iniziale, caratterizzato da

un'aumentata deposizione di fibre collagene in sede perivascolare, peribronchiale e peribronchiolare (Figura 6). L'entità dell'alterazione architetturale generata varia al variare della dose di anticorpo somministrata e la gravità del danno è direttamente proporzionale alla quantità.

Inoltre, è interessante notare che i campioni biotipici ottenuti dai topi trattati con il mab $VH_{PAM}-V\kappa13B8$ hanno mostrato un'architettura polmonare normale (Figura 6).

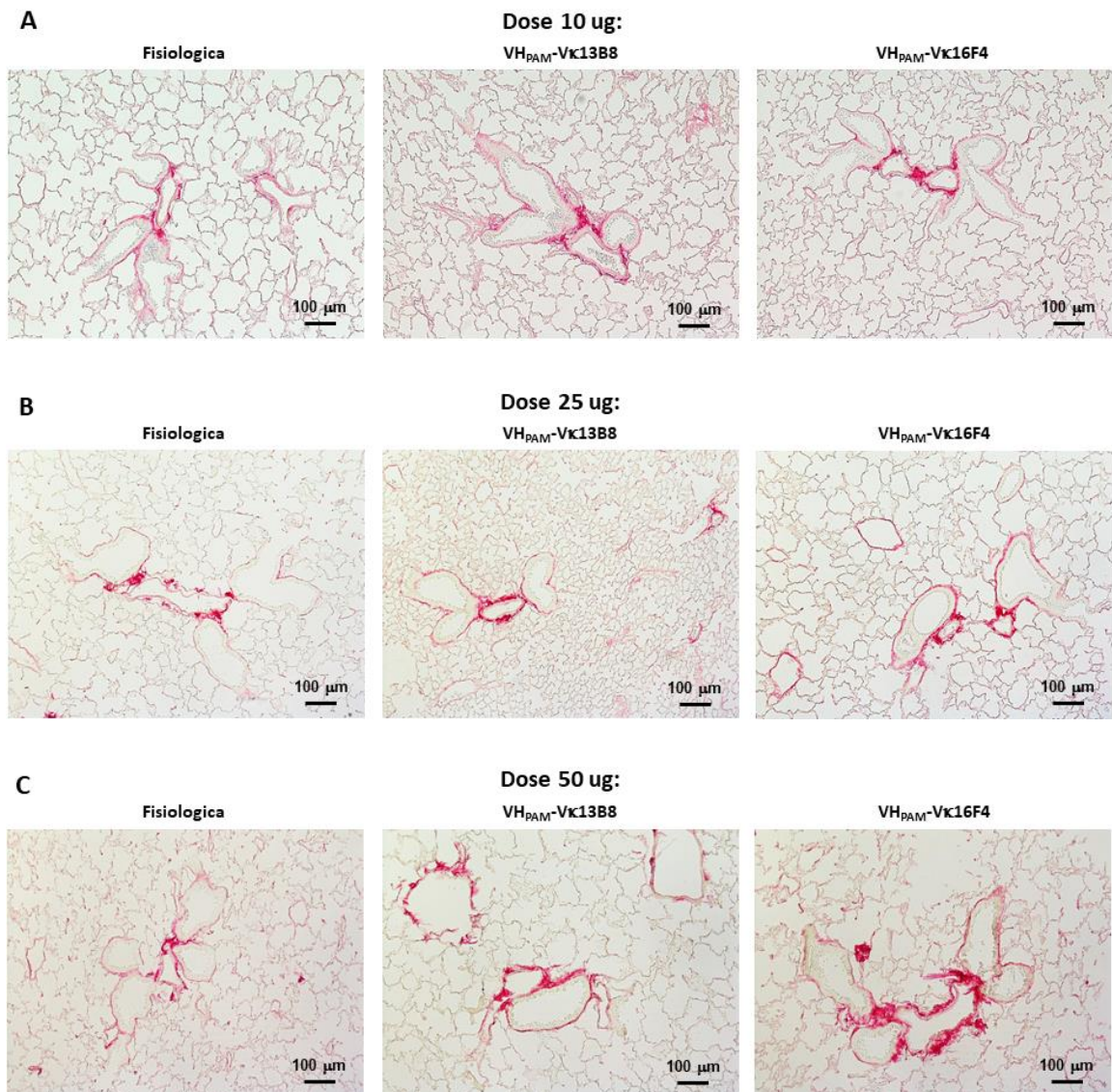


Figura 6: *Sezioni istologiche di polmone prelevato al giorno 14 da topi C57BL/6- $hPDGFR\alpha$ dopo iniezione endovena di anticorpo monoclonale stimolante anti- $PDGFR\alpha$ umano $VH_{PAM}-V\kappa16F4$ in dose di (A)10 ug, (B) 25 ug e (C)50 ug e iniezione di soluzione fisiologica e anticorpo monoclonale anti- $PDGFR\alpha$ umano non stimolante $VH_{PAM}-V\kappa13B8$ per il controllo. Le sezioni istologiche sono state colorate con Picrosirius Red. Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.*

Per determinare se l'aumentata deposizione di connettivo nel tessuto polmonare fosse dovuta ad un'aumentata sintesi di collagene, l'espressione del gene murino Col1A1 nell'mRNA estratto dal polmone è stata analizzata mediante real-time PCR quantitativa (Figura 7). Abbiamo osservato un progressivo incremento nell'espressione del gene del collagene in seguito ad iniezione endovenosa di mab $VH_{PAM}-V\kappa16F4$ alle tre diverse concentrazioni, in particolare con una differenza statisticamente significativa rispetto alla soluzione fisiologica alla dose di 50 ug. Al contrario, l'iniezione endovenosa di mab $VH_{PAM}-V\kappa13B8$ non ha generato cambiamenti significativi rispetto ai livelli di trascrizione basali.

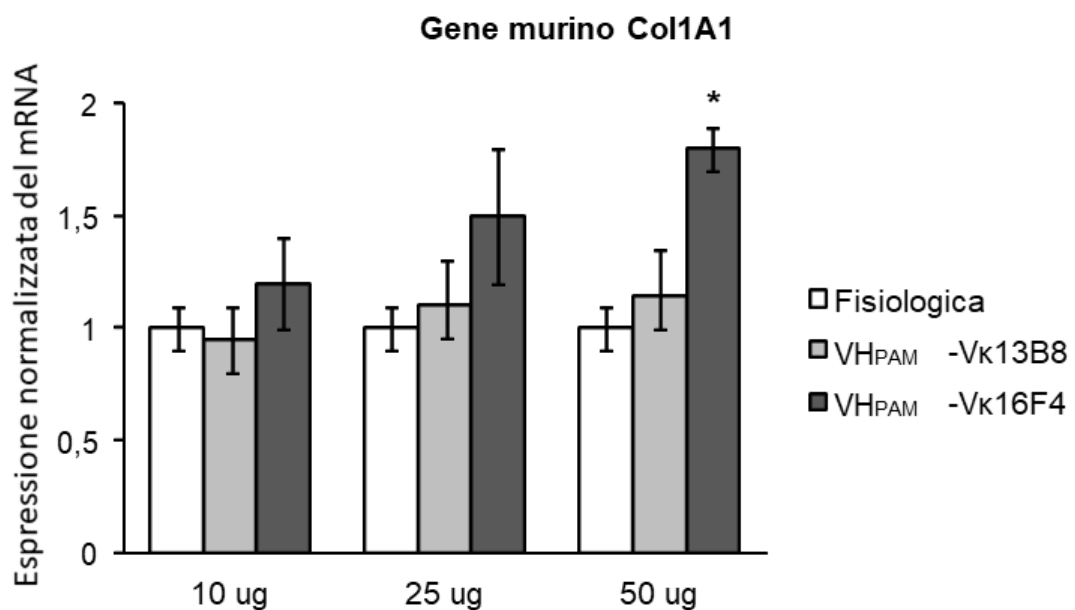


Figura 7: *Analisi, mediante real-time PCR quantitativa, dell'espressione del gene murino Col1A1 nell'mRNA estratto da polmone, prelevato al giorno 14, di topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α sottoposti ad iniezione endovenosa con soluzione fisiologica, mab non stimolante $VH_{PAM}-V\kappa13B8$, mab stimolante $VH_{PAM}-V\kappa16F4$. I valori medi per ciascuna coorte di topi sono stati espressi in proporzione rispetto a quello dei topi controllo trattati con soluzione fisiologica e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. * = $P < 0.05$*

Per verificare che le differenze nella risposta alla stimolazione fossero dovute alla dose incrementale di anticorpo somministrato e non ad una differente espressione del PDGFR α umano nei topi appartenenti alle varie coorti sperimentali, il numero di copie del transgene è stato valutato mediante real-time PCR quantitativa nell'mRNA estratto da polmone. I risultati ottenuti hanno dimostrato livelli di espressione del PDGFR α umano simili in tutti i campioni analizzati (Figura 8).

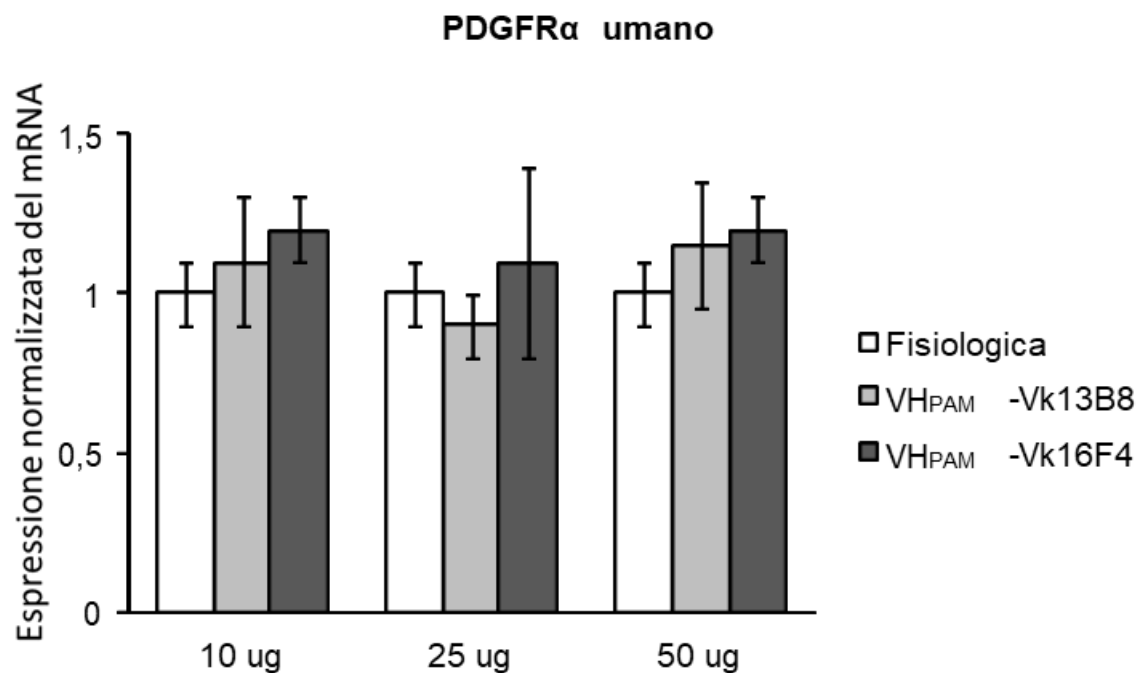


Figura 8: *Analisi, mediante real-time PCR quantitativa, dell'espressione del PDGFR α umano nell' mRNA ottenuto da biopsie polmonari, prelevate al giorno 14, di topi C57BL/6-hPDGFR α sottoposti ad iniezione endovenosa di soluzione fisiologica, mab non stimolante VHPAM-Vκ13B8, mab stimolante VHPAM-Vκ16F4. I valori medi per ciascuna coorte di topi sono stati espressi in percentuale rispetto a quello dei topi controllo trattati con soluzione fisiologica e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato.*

4.2 Titolo degli anticorpi murini diretti contro gli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano

La concentrazione degli anticorpi murini diretti contro mab VH_{PAM}-VK16F4 è stata quantificata per valutare l'influenza della reazione immunitaria dei topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α sulla presenza degli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano. La risposta anticorpale è stata valutata tramite l'analisi immunologica del siero con il saggio ELISA effettuata in tre timepoint differenti (Figura 9).

Analizzando i dati ottenuti per le tre differenti concentrazioni: 10 ug, 25 ug e 50 ug di mab VH_{PAM}-VK16F4 inoculato, si rileva un titolo maggiore degli anticorpi murini diretti contro gli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano rispetto ai dati ottenuti dal gruppo di controllo a cui è stata iniettata soluzione fisiologica (Figura 9).

La presenza delle lesioni tipiche del fenotipo sclerodermico umano evidenzia che gli anticorpi murini diretti contro gli anticorpi monoclonali stimolanti anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-VK16F4 non hanno un effetto neutralizzante.

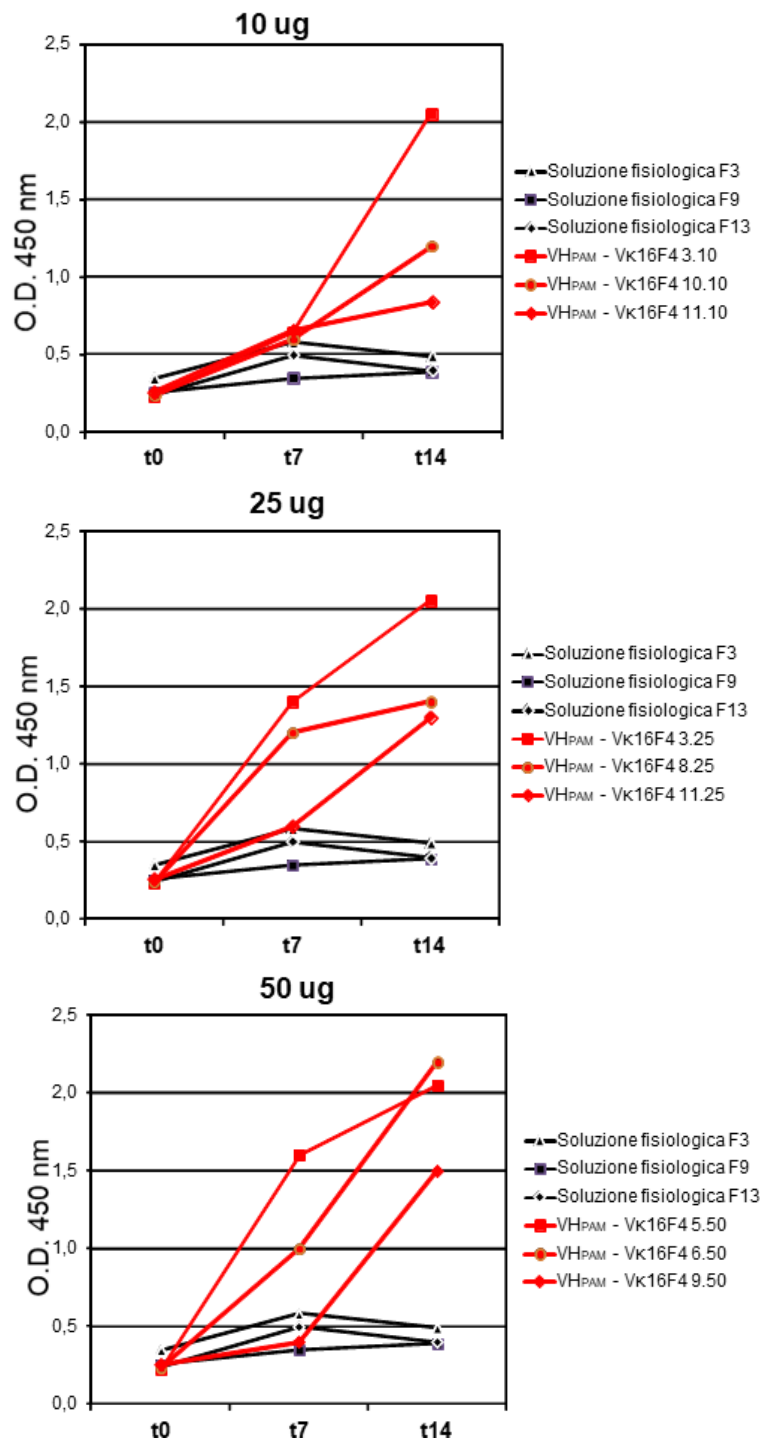


Figura 9: Rilevazione degli anticorpi anti mab $VH_{PAM} - Vk16F4$ tramite il saggio ELISA sul siero dei topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α ($n=3$ per gruppo) a cui è stato somministrato per via endovenosa (A) 10ug, (B) 25ug e (C) 50ug di mab $VH_{PAM} - Vk16F4$ comparati con i risultati ottenuti dal gruppo di controllo ($n=3$) a cui è stata somministrata la soluzione fisiologica. I risultati sono rappresentativi di tre analisi indipendenti effettuate in 3 timepoint diversi.

4.3 Induzione di fibrosi cutanea e polmonare mediante doppia iniezione endovenosa di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano

La seconda fase di questo lavoro ha previsto l'impiego della dose che si è dimostrata maggiormente in grado di indurre fibrosi. La doppia somministrazione di mab VH_{PAM}-V κ 16F4 ha determinato un quadro di notevole fibrosi cutanea e un danno polmonare iniziale.

Le biopsie di cute prelevate al giorno 21 e colorate con Picrosirius Red hanno documentato nei topi trattati con l'anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 16F4, in confronto al gruppo che ha ricevuto la soluzione fisiologica, un ispessimento cutaneo evidente ed un'aumentata deposizione di fibre collagene nel derma, densamente impacchettate e disposte in modo irregolare (Figura 10C). Inoltre, abbiamo osservato una riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo che è stato parzialmente sostituito dall'infiltrazione di fibre collagene.

Viceversa, l'iniezione endovenosa di mab non-stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-V κ 13B8 non ha prodotto alcun cambiamento nella cute che presenta un aspetto morfologico normale (Figura 10B).

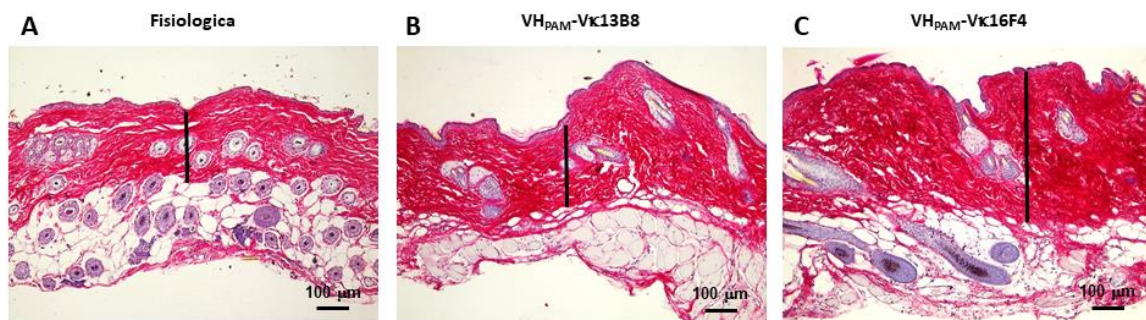


Figura 10: *Sezioni istologiche (ad ingrandimento 10x) di cute del dorso prelevate al giorno 21 da topi C57BL/6-hPDGFR α dopo iniezione endovenosa di (A) soluzione fisiologica, (B) di mab non stimolante VH_{PAM}-V κ 13B8, (C) di mab stimolante VH_{PAM}-V κ 16F4. Le sezioni sono state colorate con Picrosirius Red. Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.*

L'esame istologico dei tessuti polmonari prelevati al giorno 21 ha evidenziato nel gruppo a cui è stato somministrato per via endovenosa l'anticorpo monoclonale

stimolante $VH_{PAM}-V\kappa16F4$, in confronto alla fisiologica, un danno in fase iniziale. Nelle sezioni colorate con Picosirius Red è stata osservata un'aumentata deposizione di fibre collagene in sede perivascolare, peribronchiale e peribronchiolare (Figura 11C).

Inoltre, la doppia somministrazione di 50 ug di mab $VH_{PAM}-V\kappa16F4$ ha indotto una reazione infiammatoria polmonare confermata dalla presenza di un infiltrato infiammatorio peribronchiolare, perivasale e interstiziale accompagnato da una distorsione dell'architettura alveolare (Figura 12C, Figura 12D).

Viceversa, la doppia iniezione endovenosa della stessa dose di mab non-stimolante anti-PDGFR α umano $VH_{PAM}-V\kappa13B8$ non ha prodotto alcun cambiamento a livello polmonare (Figura 11B, Figura 12B).

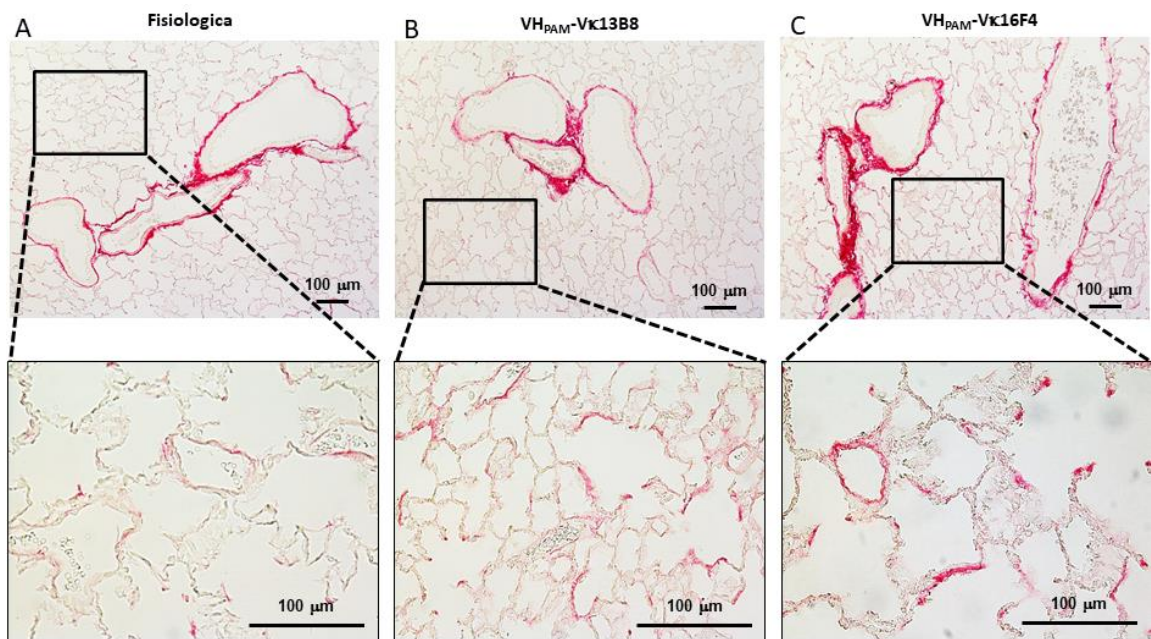


Figura 11: Sezioni istologiche di polmone prelevato al giorno 21 da topi C57BL/6-*hPDGFRα* dopo doppia iniezione endovena di (A) soluzione fisiologica, (B) di anticorpo monoclonale anti-PDGFR α umano non stimolante $VH_{PAM}-V\kappa13B8$ per il controllo e (C) di anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFR α umano $VH_{PAM}-V\kappa16F4$ in dose di 50 ug e). Le sezioni istologiche sono state colorate con Picosirius Red. Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

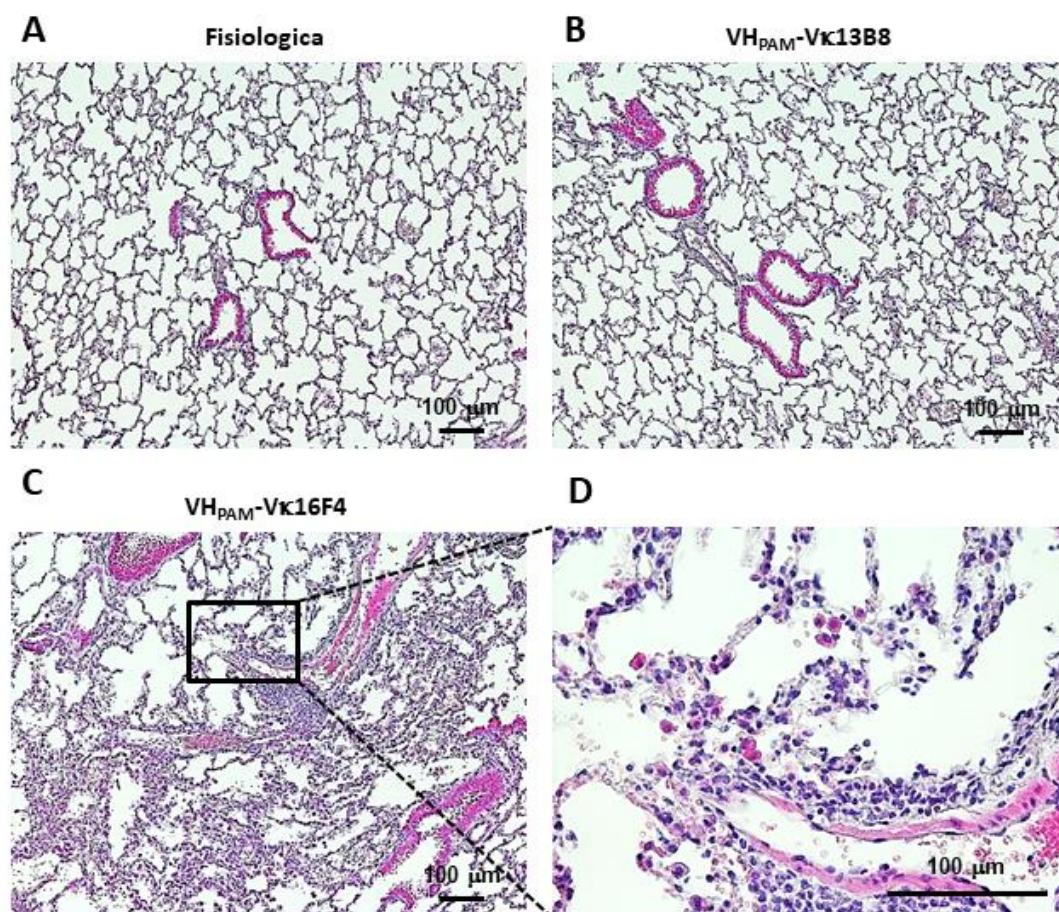


Figura 12: A-C) Sezioni istologiche colorate con H&E (10x) di polmone prelevato al giorno 21 da topi C57BL/6-*hPDGFRα* ricevuti doppia iniezione endovenosa di (A) soluzione fisiologica, (B) anticorpo monoclonale anti-PDGFRα umano non stimolante VH_{PAM}-Vκ13B8 per il controllo e (C) di anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFRα umano VH_{PAM}-Vκ16F4. D) Immagine microscopica all'ingrandimento 20x della sezione di tessuto prelevato dal gruppo trattato con anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFRα umano VH_{PAM}-Vκ16F4. Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

L'espressione del gene murino *Col1A1* nell'mRNA estratto dal polmone è stata analizzata mediante real-time PCR quantitativa (Figura 13). In seguito all'analisi dei risultati ottenuti è stato osservato un incremento statisticamente significativo nell'espressione del gene del collagene come conseguenza all'iniezione endovenosa di mab VH_{PAM}-Vκ16F4, rispetto alla soluzione fisiologica. Al contrario, l'iniezione endovenosa di mab VH_{PAM}-Vκ13B8 non ha generato cambiamenti rilevanti nei livelli di trascrizione del gene del collagene rispetto ai livelli di trascrizione basali.

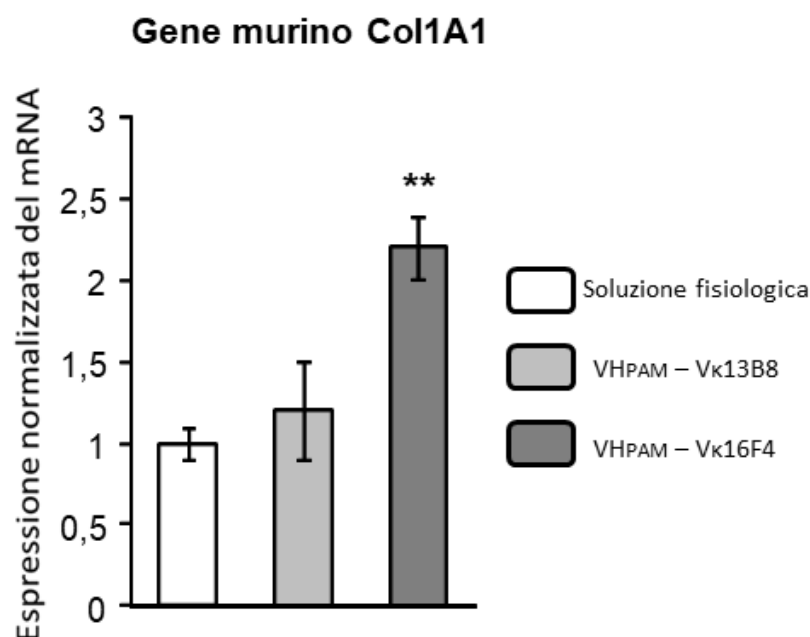


Figura 13: *Analisi mediante real-time PCR quantitativa dell'espressione del gene murino Col1A1 nell'mRNA estratto da tessuto polmonare, prelevato al giorno 21, di topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α sottoposti ad iniezione endovenosa con soluzione fisiologica, mab non stimolante VHPAM-V κ 13B8, mab stimolante VHPAM-V κ 16F4. I valori medi per ciascuna coorte di topi sono stati espressi in proporzione rispetto a quello dei topi controllo trattati con soluzione fisiologica e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. ** = $P < 0.05$*

Per verificare che le differenze nella risposta alla stimolazione fossero dovute alla somministrazione di anticorpo stimolante VHPAM-V κ 16F4 e non ad una differente espressione del PDGFR α umano nei topi appartenenti alle varie coorti sperimentali, il numero di copie del transgene è stato valutato mediante real-time PCR quantitativa nell'mRNA estratto da polmone. I risultati ottenuti hanno dimostrato livelli di espressione del PDGFR α umano simili in tutti i campioni analizzati (Figura 14).

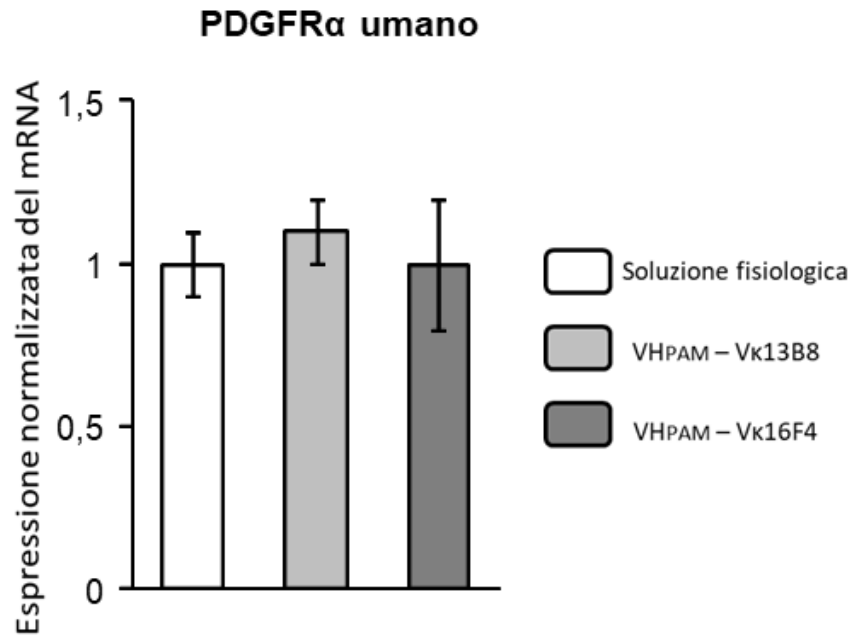


Figura 14: *Analisi, mediante real-time PCR quantitativa, dell'espressione del PDGFR α umano nell'mRNA ottenuto da biopsie polmonari, prelevate al giorno 21, di topi C57BL/6-hPDGFR α sottoposti ad iniezione endovenosa di soluzione fisiologica, mab non stimolante VHPAM-V κ 13B8, mab stimolante VHPAM-V κ 16F4. I valori medi per ciascuna coorte di topi sono stati espressi in percentuale rispetto a quello dei topi controllo trattati con soluzione fisiologica e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato*

5. Discussione

La sclerosi sistemica rappresenta una malattia autoimmune con un'incidenza in costante aumento e con un forte impatto sulla qualità di vita dei pazienti [4][73].

Grazie alla disponibilità dei modelli animali che riproducono gli aspetti salienti del processo patologico è possibile studiare diversi dettagli della patogenesi di questa malattia complessa. Numerosi modelli sperimentali di SSc sono già stati descritti nella letteratura scientifica [76], però è ancora montata sentita l'esigenza di crearne nuovi al fine di definire e identificare nuovi bersagli molecolari a scopo diagnostico e terapeutico.

In una fase precedente di questo lavoro, il gruppo di ricerca del prof. Armando Gabrielli è stato in grado di generare, partendo dal repertorio immunoglobulinico di soggetti affetti da sclerosi sistemica, un pannello ristretto di anticorpi monoclonali reattivi nei confronti del PDGFR α umano e dotati di attività biologica, potendo così indurre gli effetti caratteristici della malattia [65]. Basandosi su questi risultati, per dimostrare l'importanza dell'attivazione del pathway del PDGFR α , è stato generato un nuovo modello sperimentale di sclerodermia. Il ceppo C57BL/6-hPDGFR α è il primo esempio di topo umanizzato a livello del PDGFR α che esprime il PDGFR α umano accanto a quello murino. La somministrazione intradermica di anticorpi monoclonali umani anti-PDGFR α in topi C57BL/6-hPDGFR α induce la fibrosi cutanea, analogamente a quanto avviene nell'uomo in corso di sclerodermia, che conferma la loro attività pro-fibrotica e la validità del nuovo modello murino [69].

Essendo la sclerodermia una patologia sistemica, la cute non è l'unico organo bersaglio coinvolto nel corso della malattia. Per questo è stata sperimentata una via sistemica di somministrazione degli anticorpi anti-PDGFR α umano per simularne l'azione naturale durante lo sviluppo della malattia. Il lavoro ha previsto come fase iniziale la selezione della dose in grado di indurre un quadro di fibrosi. Dopo aver sperimentato 3 dosi diverse si è giunti alla conclusione che la dose di anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFR α umano VHPAM-VK16F4 in grado di indurre in maniera robusta fibrosi cutanea e polmonare è di 50 ug, mentre dosi inferiori non producono lesioni di entità

rilevante. Le alterazioni a livello polmonare testimoniano l'effetto sistemico, limitato però a livello perivasale, peribronchiale e peribronchiolare, indicative di uno stadio iniziale di fibrosi polmonare. La presenza di un processo fibrotico rilevante nei topi che hanno ricevuto la dose di 50 ug di mab anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-VK16F4 è stato confermato dall'aumento statisticamente significativo dell'espressione del gene murino Col1A1.

La seconda fase del lavoro ha previsto una doppia iniezione endovenosa di 50 ug di anticorpo monoclonale stimolante anti-PDGFR α umano VH_{PAM}-VK16F4, distanziata di una settimana, nel tentativo di riprodurre una stimolazione cronica da parte degli autoanticorpi in corso di malattia. I tessuti prelevati al 21esimo giorno hanno mostrato un quadro di fibrosi. A livello cutaneo è stato rilevato un ispessimento del derma associato ad una maggiore deposizione di collagene rispetto al protocollo sperimentale con singola dose. Nei polmoni è stata osservata, oltre a un'aumentata deposizione di fibre collagene in sede perivascolare, peribronchiale e peribronchiolare, anche la presenza di un'inflammatione interstiziale non presente nel protocollo con singola dose.

In conclusione, grazie all'impiego di un modello murino umanizzato a livello del PDGFR α umano e a un metodo di somministrazione degli autoanticorpi monoclonali che simula l'attivazione cronica del sistema immunitario dei pazienti affetti da sclerodermia, siamo riusciti a generare un nuovo modello sperimentale di sclerosi sistemica. Questo modello, opportunamente sviluppato e ulteriormente caratterizzato, permetterà lo studio approfondito dei meccanismi che sono alla base della fibrosi in corso di sclerosi sistemica, in particolari del ruolo degli anticorpi anti-PDGFR α umano. Inoltre, questo modello sperimentale potrebbe essere impiegato nella ricerca di molecole antagoniste della fibrosi indotta mediante il pathway del PDGFR α , che potrebbero rappresentare una base per la ricerca di eventuali terapie. In particolare, molecole che legando il PDGFR α , impedirebbero il legame di anticorpi agonisti al recettore stesso.

6. Bibliografia

1. Watanabe T, Nishimoto T, Mlakar L, Heywood J, Malaab M, Hoffman S, et al. Optimization of a murine and human tissue model to recapitulate dermal and pulmonary features of systemic sclerosis. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179917. PubMed PMID: 28651005.
2. Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2008;37(4):223-35. PubMed PMID: 17692364.
3. Ingegnoli F, Ughi N, Mihai C. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018; 32:223-240.
4. F.M. Meier, K.W. Frommer, R. Dinser, U.A. Walker, L. Czirjak, C.P. Denton, et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis*, 2012; 1355-1360.
5. Black CM, Welsh KI, Maddison PJ, Jayson MI, Bernstein RM. HLA antigens, autoantibodies and clinical subsets in scleroderma. *Br J Rheumatol*. 1984; 23:267-71.
6. M. Freire, A. Rivera, B. Sopena, C. Tolosa Vilella, A. Guillen-Del Castillo, D. Colunga Arguelles, et al. Clinical and epidemiological differences between men and women with systemic sclerosis: a study in a Spanish systemic sclerosis cohort and literature review. *Clin Exp Rheumatol*. 2017; 106:89-97.
7. Lo Monaco A1, Bruschi M, La Corte R, Volpinari S, Trotta F. Epidemiology of systemic sclerosis in a district of northern Italy. *Clin Exp Rheumatol*. 2011 Mar-Apr;29(2 Suppl 65):S10-4. Epub 2011 May 12.
8. Tan F, Arnett F. Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon. *Curr Opin Rheumatol*. 2000; 12(6):511-9.
9. B.D. Korman, L.A. Criswell. Recent advances in the genetics of systemic sclerosis: toward biological and clinical significance. *Curr Rheumatol Rep*. 2015; 17(3):21.
10. Feghali-Bostwick C, Medsger T Jr, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1956–63.
11. Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300

- Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(5):822-7. PubMed PMID: 19596691.
12. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;33(1):3-11. PubMed PMID: 19349147.
 13. Moroncini G, Mori S, Tonnini C, Gabrielli A.. Role of viral infections in the etiopathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2013; 31(2 Suppl 76):3-7.
 14. Stern EP, Denton CP. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2015;41(3):367-82. PubMed PMID: 26210124.
 15. Manetti M, Romano E, Rosa I, Guiducci S, Bellando-Randone S, De Paulis A, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(5):924-34. PubMed PMID: 28062404.
 16. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 1974; 54:880–889.
 17. Uitto J, Bauer EA, Eisen AZ. Scleroderma: increased biosynthesis of triple-helical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase by skin fibroblasts in culture. *J Clin Invest* 1979; 64:921–930.
 18. Biondi R, Coaccioli S, Lattanzi S, Puxeddu A, Papini M. Oxidant/antioxidant status in patients with Raynaud's disease. *Clin Ter* 2008; 159:77–81.
 19. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, et al. Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum.* 2001;44(11):2653-64. PubMed PMID: 11710721
 20. Chizzolini C, Boin F. The role of the acquired immune response in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015;37(5):519-28. PubMed PMID: 26152639.
 21. Famularo G, Procopio A, Giacomelli R, et al. Soluble interleukin-2 receptor, interleukin-2 and interleukin-4 in sera and supernatants from patients with progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990; 81:368–372.
 22. Distler JH, Akhmetshina A, Schett G, Distler O. Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(2):98-103. PubMed PMID: 18984611.
 23. O. Molberg, A.M. Hoffmann-Vold. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: progress in screening and early diagnosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2016; 28:613-618
 24. Orton SM, Peace-Brewer A, Schmitz JL, Freeman K, Miller WC, Folds JD. Practical evaluation of methods for detection and specificity of autoantibodies to

- extractable nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(2):297-301. PubMed PMID: 15013979.
25. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(2):80-93. PubMed PMID: 12718748.
 26. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(4):534-40. PubMed PMID: 12649400.
 27. Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003;49(3):399-412. PubMed PMID: 12794797.
 28. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum*. 2006;54(3):963-73. PubMed PMID: 16508979.
 29. Moroncini G, Svegliati Baroni S, Gabrielli A. Agonistic antibodies in systemic sclerosis. *Immunol Lett*. 2018;195:83-7. PubMed PMID: 29032187.
 30. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009; 360(19):1989-2003.
 31. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2737-47. PubMed PMID: 24122180.
 32. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet*. 2017;390(10103):1685-99. PubMed PMID: 28413064.
 33. Harrison, *Principi di Medicina Interna*.
 34. Alharbi S, Ahmad Z, Bookman A, Touma Z1, Sanchez-Guerrero J, Mitsakakis N, Johnson S. Epidemiology and Survival of Systemic Sclerosis-Systemic Lupus Erythematosus Overlap Syndrome *J Rheumatol*. 2018;45(10):1406-1410.
 35. Cutolo M, Smith V, Furst D, Khanna D, Herrick A. Points to consider-Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2017; 56:v45-v48.
 36. M. Matucci-Cerinic, T. Krieg, L. Guillemin, B. Schwierin, D. Rosenberg, P. Cornelisse, et al. Elucidating the burden of recurrent and chronic digital ulcers in systemic sclerosis: long-term results from the DUO Registry. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75:1770-1776.
 37. S. Cappelli, S. Bellando Randone, G. Camiciottoli, A. De Paulis, S. Guiducci, M. Matucci-Cerinic. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: where do we stand? *Eur Respir Rev – Offic J Eur Respir Soc*. 2015; 24(137):411-419.

38. J.G. Coghlan, C.P. Denton, E. Grunig, D. Bonderman, O. Distler, D. Khanna, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73:1340-1349.
39. D. Khanna, R.D. Hays, P. Maranian, J.R. Seibold, A. Impens, M.D. Mayes, et al. Reliability and validity of the university of California, Los Angeles scleroderma clinical trial Consortium gastrointestinal tract instrument. *Arthritis Rheum.* 2009; 61:1257-1263.
40. A.B. Shreiner, C. Murray, C. Denton, D. Khanna Gastrointestinal manifestations of systemic sclerosis *J Scleroderma Relat Dis.* 2016; 1:247-256.
41. A.L. Hachulla, D. Launay, V. Gaxotte, P. de Groote, N. Lamblin, P. Devos, et al. Cardiac magnetic resonance imaging in systemic sclerosis: a cross-sectional observational study of 52 patients. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68:1878-1884.
42. H. Penn, A.J. Howie, E.J. Kingdon, C.C. Bunn, R.J. Stratton, C.M. Black, et al. Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes. *QJM Mon J Assoc Phys.* 2007; 100:485-494.
43. M. Bonifazi, I. Tramacere, G. Pomponio, B. Gabrielli, E.V. Avvedimento, C. La Vecchia, et al. Systemic sclerosis (scleroderma) and cancer risk: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Rheumatology.* 2013; 52:143-154.
44. Koenig M., Joyal F., Fitzler M.J., et al. Autoantibodies and Microvascular Damage Are Independent Predictive Factors for the Progression of Raynaud's Phenomenon to Systemic Sclerosis *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3902–3912.
45. Avouac J, Fransen J, Walker UA, Riccieri V, Smith V, Muller C, et al. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):476-81. PubMed PMID: 21081523.
46. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 2006;354(25):2655-66. PubMed PMID: 16790698.
47. Ramos-Casals M, Fonollosa-Pla V, Brito-Zeron P, Siso-Almirall A. Targeted therapy for systemic sclerosis: how close are we? *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(5):269-78. PubMed PMID: 20386562.
48. Morrisroe K, Stevens W, Proudman S, Nikpour M. A systematic review of the epidemiology, disease characteristics and management of systemic sclerosis in Australian adults. *Int J Rheum Dis.* 2017;20(11):1728-1750.
49. Morrisroe K, Stevens W, Sahhar J, Rabusa C, Nikpour M, Proudman. Australian Scleroderma Interest Group (ASIG). Epidemiology and disease characteristics of systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension: results from a real-life screening programme. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):42

50. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2018;62:44-62. PubMed PMID: 29155002.
51. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47 Suppl 5:v2-4.
52. Baroni S, Santillo M, 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.* 2006; 354(25):2667-76.
53. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008; 22:1276–312.
54. Kazlauskas A. and Cooper J.A. Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* 1989; 58: 1121-1133.
55. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* 2009;16(2):303-13. PubMed PMID: 19217431.
56. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene.* 2017;614:1-7. PubMed PMID: 28267575.
57. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79:1283–316.
58. Zheng XY, Zhang JZ, Tu P, Ma SQ. Expression of platelet-derived growth factor B- chain and platelet-derived growth factor beta-receptor in fibroblasts of scleroderma. *J Dermatol Sci* 1998;18:90–97.
59. Claesson-Welsh L., Eriksson A., Westermark B. and Heldin C.H. cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 4917-4921.
60. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:255–73
61. Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 1992;175:1227–34.
62. Svegliati S, Cancellio R, Sambo P, et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2: amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem* 2005; 280:36474-82.
63. Moroncini G et al, *World Biomedical Frontiers, Arthritis* 2015. ISSN: 2328-0166.

64. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento EV. Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(6):640-5. PubMed PMID: 18083509.
65. G. Moroncini, A. Grieco, G. Nacci, C. Paolini, C. Tonnini, K.N. Pozniak, M. Cuccioloni, M. Mozzicafreddo, S. Svegliati, M. Angeletti, A. Kazlauskas, E.V. Avvedimento, A. Funaro, A. Gabrielli, Epitope specificity determines pathogenicity and detectability of anti-platelet-derived growth factor receptor alpha autoantibodies in systemic sclerosis, *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67:1891–1903.
66. G. Moroncini, M. Cuccioloni, M. Mozzicafreddo, K.N. Pozniak, A. Grieco, C. Paolini, C. Tonnini, T. Spadoni, S. Svegliati, A. Funaro, M. Angeletti, A. Gabrielli, Characterization of binding and quantification of human autoantibodies to PDGFRalpha using a biosensor-based approach, *Anal. Biochem.* 2017; 528:26–33.
67. Markova MS, Zeskand J, McEntee B, Rothstein J, Jimenez SA, Siracusa LD. A role for the androgen receptor in collagen content of the skin. *J Invest Dermatol.* 2004;123(6):1052-6. PubMed PMID: 15610513.
68. P. Fraticelli, S. De Vita, N. Franzolini, S. Svegliati, C.A. Scott, C. Tonnini, T. Spadoni, B. Gabrielli, G. Pomponio, G. Moroncini, A. Gabrielli, Reduced type I collagen gene expression by skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis after one treatment course with rituximab, *Clin. Exp. Rheumatol.* 2015; 33:S160–S167.
69. Luchetti, M.M., Moroncini, G., Jose Escamez, M., Svegliati Baroni, S., Spadoni, T., Grieco, A., Paolini, C., Funaro, A., Avvedimento, E.V., Larcher, F., Del Rio, M., Gabrielli, A., 2016. Induction of scleroderma fibrosis in skin-humanized mice by administration of anti-platelet-derived growth factor receptor agonistic autoantibodies. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68(9):2263-2273.
70. Svegliati S, Amico D, Spadoni T, Fischetti C, Finke D, Moroncini G, et al. Agonistic Anti-PDGF Receptor Autoantibodies from Patients with Systemic Sclerosis Impact Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Function In Vitro. *Front Immunol.* 2017;8:75. PubMed PMID: 28228756.
71. Moroncini G, Paolini C, Orlando F, Capelli C, Grieco A, Tonnini C, Agarbati S, Mondini E, Saccomanno S, Goteri G, Svegliati Baroni S, Provinciali M, Introna M, Del Papa N, Gabrielli A. Mesenchymal stromal cells from human umbilical cord prevent the development of lung fibrosis in immunocompetent mice. *PLoS One.* 2018; 13(6):e0196048.
72. Soare A, Ramming A, Avouac J, Distler JHW. Updates on animal models of systemic sclerosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders.* 2016;1(3):266-76. PubMed PMID: ISI:000404600200005.
73. Yue X, Yu X, Petersen F, Riemekasten G. Recent advances in mouse models for systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2018;17(12):1225-34. PubMed PMID: 30316997.

74. Marangoni RG, Varga J, Tourtellotte WG. Animal models of scleroderma: recent progress. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(6):561-70. PubMed PMID: 27533324.
75. Manetti M1, Rosa I, Milia AF, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(9):1700-9.
76. Asano Y, Sato S. Animal models of scleroderma: current state and recent development. *Curr Rheumatol Rep*. 2013; 15:382.
77. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum*. 2010;62(10):2831-44. PubMed PMID: 20617524.
78. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipodystrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum*. 2011;63(6):1707-17. PubMed PMID: 21370225.
79. Abzazou T, Salvadó H, Cárdenas-Youngs Y, Becerril-Rodríguez A, Cebirán EMC, Huguet A, Araujo RM. Characterization of nutrient-removing microbial communities in two full-scale WWTP systems using a new qPCR approach. *Sci Total Environ*. 2018; 618:858-865.
80. Liang M, Lv J, Zou L, Yang W, Xiong Y, Chen X, Guan M, He R, Zou H. A modified murine model of systemic sclerosis: bleomycin given by pump infusion induced skin and pulmonary inflammation and fibrosis. *Lab Invest*. 2015; 95(3):342-50.
81. Wermuth PJ, Jimenez SA. Abrogation of transforming growth factor- β -induced tissue fibrosis in TBRIcaCol1a2Cre transgenic mice by the second generation tyrosine kinase inhibitor SKI-606 (Bosutinib). *PLoS One*. 2018; 13(5):e0196559.
82. Manne J, Markova M, Siracusa LD, Jimenez SA. Collagen content in skin and internal organs of the tight skin mouse: an animal model of scleroderma. *Biochem Res Int*. 2013; 2013:436053.
83. Orlando F, Paolini C, Agarbati S, Tonnini C, Grieco A, Capelli C, Introna M, Provinciali M, Gabrielli A, Moroncini G. Induction of Mouse Lung Injury by Endotracheal Injection of Bleomycin. *J Vis Exp*. 2019; 30;(146).
84. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods*. 2003; 278(1-2):261-9.
85. Orlando, F., Paolini, C., Agarbati, S., Tonnini, C., Grieco, A., Capelli, C., Introna, M., Provinciali, M., Gabrielli, A., Moroncini, G. Induction of Mouse Lung Injury by Endotracheal Injection of Bleomycin. *J. Vis. Exp.* (146), e58922, doi:10.3791/58922 (2019).

- 86.** Myzithras M. , Tammy Bigwarfe, Hua Li, Erica Waltz, Jennifer Ahlberg , Craig Giragossian, and Simon Roberts Utility of immunodeficient mouse models for characterizing the preclinical pharmacokinetics of immunogenic antibody therapeutics. MABS 2016, VOL. 8, NO. 8, 1606–1611