



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

Tesi di laurea:

**NUOVI MODELLI SPERIMENTALI DI SCLERODERMIA:
INDUZIONE DI FIBROSI MEDIANTE SOMMINISTRAZIONE SOTTOCUTE
DI ANTICORPI ANTI-PDGFR α**

Tesi di Laurea di:

Ylenia Ferraioli

Relatore:

Prof. Gianluca Moroncini

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

1. <u>INTRODUZIONE</u>	5
1.1. Sclerosi sistemica	5
1.1.1 Epidemiologia	5
1.1.2 Manifestazioni cliniche	6
1.1.3 Eziopatogenesi	11
1.1.4 Autoanticorpi	13
1.1.5 Diagnosi	16
1.1.6 Terapia	18
1.1.7 Decorso e prognosi	22
1.2. PDGF	23
1.2.1 Recettore del PDGF	24
1.2.2 Ruolo del PDGF nella sclerodermia	26
1.2.3 Anticorpi contro il recettore del PDGF	27
1.2.4 Autoanticorpi monoclonali umani ricombinanti anti-PDGFR α	30
1.3. Modelli murini di sclerodermia	33
1.4. Nuovo modello murino di fibrosi cutanea	37
1.4.1 Generazione del topo transgenico per il PDGFR α umano	38
1.4.2 Induzione di fibrosi cutanea mediante iniezione intradermica di anticorpi monoclonali anti-PGFR α umano	40
2. <u>SCOPO DELLA RICERCA</u>	43
3. <u>MATERIALI E METODI</u>	44
3.1 Genotipizzazione	44

3.2 Somministrazione sottocutanea continua di anticorpi anti PDGFR α umano	45
3.3 Istologia e immunoistochimica	47
3.4 Determinazione dell'espressione di collagene nei tessuti	48
3.5 Dosaggio dell'idrossiprolina	48
3.6 Analisi statistica	49
4. <u>RISULTATI</u>	50
4.1 Induzione di fibrosi cutanea mediante somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano	50
4.2 Induzione di un iniziale danno polmonare mediante somministrazione sottocutanea di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano	53
5. <u>DISCUSSIONE</u>	60
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	63

1. INTRODUZIONE

1.1 Sclerosi Sistemica

La sclerodermia o sclerosi sistemica (SSc) è una malattia sistemica autoimmune classificata tra le connettiviti. È una patologia caratterizzata principalmente da disregolazione immunitaria, vasculopatia obliterante e accumulo di collagene e di altri componenti della matrice connettivale a livello 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).

Tra le malattie reumatologiche è quella con maggiore mortalità, morbilità e peggioramento importante della qualità di vita dei pazienti affetti.

1.1.1 Epidemiologia

Gli studi epidemiologici nell'ambito della sclerosi sistemica, a causa dell'evoluzione dei criteri di classificazione nel corso del tempo e delle differenze geografiche di queste misurazioni, sono contrastanti nelle stime di prevalenza e incidenza. I dati disponibili indicano una prevalenza compresa tra 50 e 300 casi / milione e un'incidenza compresa tra 2,3 e 22,8 casi / milione / anno.

I tassi di incidenza e prevalenza più alti si osservano in Europa, seguono Nord America, Centro e Sud America mentre i tassi più bassi si hanno in Asia [1].

Colpisce con maggiore frequenza la fascia d'età compresa tra i 30 e i 50 anni [2].

Le femmine hanno un rischio molto più elevato di contrarre la malattia rispetto ai maschi con un rapporto che va da 3:1 a 14:1 [3]

Per quanto riguarda la diffusione della malattia in Italia, l'ultimo studio effettuato 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) [4].

La sclerosi sistemica può anche associarsi ad altre patologie reumatologiche come il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide, la polimiosite o la sindrome di Sjogren. Vi è una correlazione anche con l'ipotiroidismo e l'ipertiroidismo, infatti la prevalenza di queste condizioni nei pazienti affetti da SSc risulta maggiore di quella nella popolazione generale [5].

1.1.2 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche della sclerosi sistemica sono espressione della vasculopatia e della fibrosi dei parenchimi colpiti. La fibrosi è causata dall'attivazione dei fibroblasti, dalla proliferazione e dall'aumentata deposizione di proteine della matrice extracellulare (ECM) come fibronectina e collagene in vari organi. La progressione della fibrosi d'organo causa perdita della normale struttura e funzione organica fino all'insufficienza d'organo.

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 (Figura 1A).

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” (Figura 1B). Circa il 35% dei pazienti presenta ulcere cutanee, soprattutto a livello acrale e delle prominenze ossee sulle superfici estensorie degli arti [6]. Le ulcere digitali possono portare a infezioni, gangrena e anche se raramente possono necessitare di amputazione, comportando disabilità e abbassamento della qualità della vita [7]. A distanza di anni dall'esordio, nella fase terminale della malattia, la cute può tornare ad ammorbidirsi e può avere un aspetto sottile e atrofico.

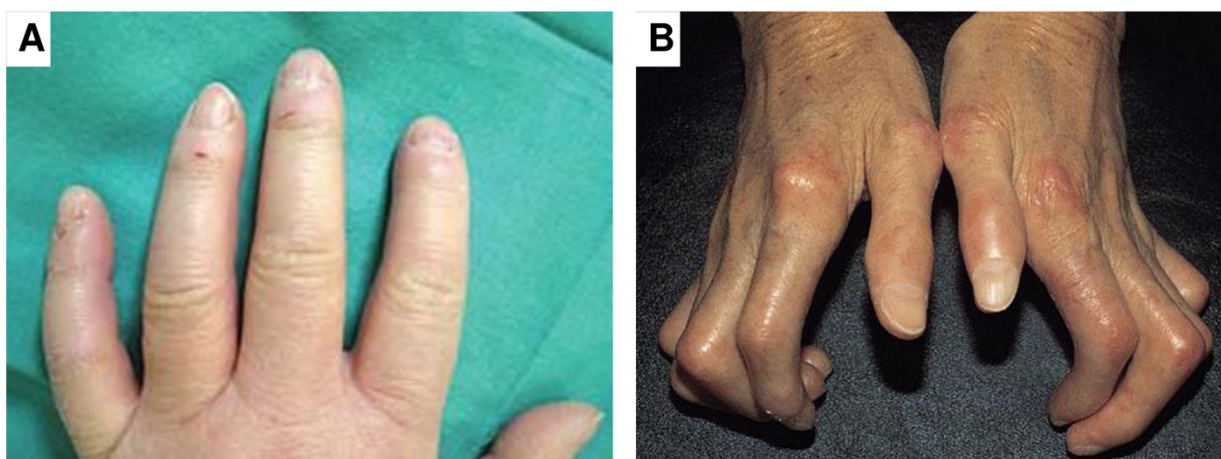


Figura 1. (A) Puffy Fingers. Nelle fasi precoci della malattia la cute delle mani è colpita da un edema simmetrico e le dita assumono un aspetto particolarmente tozzo. **(B) Dita ad artiglio.** Dopo un periodo di settimane o mesi l’iniziale fase di edema lascia spazio ad una fase fibrotica con un caratteristico atteggiamento in flessione delle dita.

Apparato respiratorio

Il coinvolgimento polmonare interessa la maggior parte (80-90%) dei pazienti con sclerosi sistemica e rappresenta attualmente la causa di morte più frequente. Le modalità più importanti di interessamento polmonare sono l’interstiziopatia e l’ipertensione polmonare. Si presuppone che le prime alterazioni avvengano precocemente, tuttavia le manifestazioni cliniche (dispnea da sforzo, facile affaticabilità) sono caratteristiche delle fasi avanzate della malattia. Il segno radiologico classico, riscontrabile mediante High Resolution Computed Tomography (HRCT), è dato da una pneumopatia infiltrativa diffusa prevalentemente alle basi con successiva evoluzione in fibrosi diffusa (Figura 2). I reperti riscontrabili all’imaging sono: opacità a vetro smerigliato (espressione di alveolite attiva o fibrosi microscopica), ispessimento dei setti interlobulari causato dalla fibrosi, aspetto “ad alveare” o “honeycombing” (spazi cistici con ispessimento delle pareti). La spirometria può evidenziare un quadro respiratorio di tipo restrittivo con diminuzione consensuale della capacità polmonare totale (TLC), della capacità vitale forzata (FVC), del flusso espiratorio forzato al primo secondo (FEV1), del volume residuo (RV) e una ridotta diffusione del monossido di carbonio (DLCO). 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 a ipertensione polmonare che spesso ha un andamento progressivo, con comparsa, oltre alla dispnea da sforzo, di angina, episodi simil-sincopali associati all’esercizio fisico e in seguito un quadro di scompenso destro. La diagnosi si

fonda sul cateterismo cardiaco che mette in evidenza un'ipertensione pre-capillare (pressione arteriosa polmonare media ≥ 25 mmHg, pressione capillare a catetere bloccato < 15 mmHg) e permette di escludere l'ipertensione polmonare post-capillare da cardiopatia sinistra. Nel 15% circa dei pazienti è evidenziabile anche una pleurite secca o essudativa.

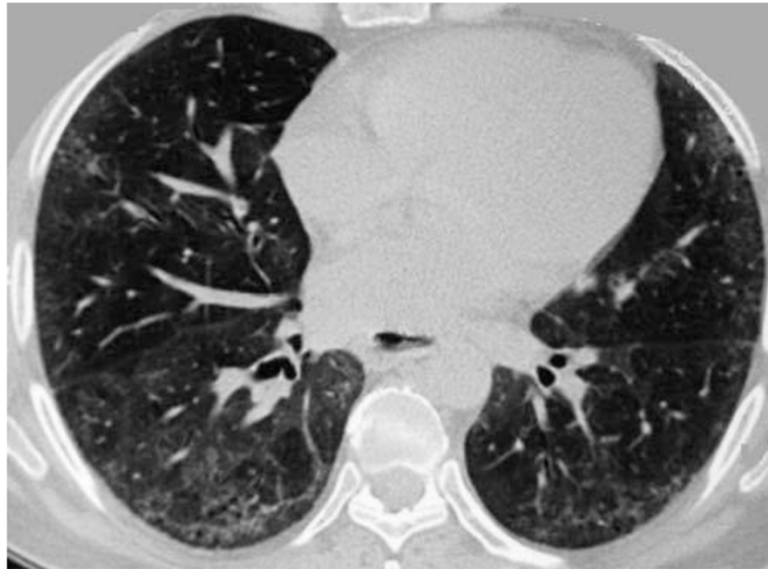


Figura 2. HRCT polmonare. Aree di iperdensità polmonare con aspetto “a vetro smerigliato”, distribuite prevalentemente in sede lobare inferiore.

Altre manifestazioni

Nell'80-90% dei casi è presente artropatia, ma solo nel 15% si riscontra una franca sinovite, più frequentemente si tratta di poliartralgie. La manifestazione osteoarticolare più frequente della malattia è l'osteolisi della falange distale delle dita delle mani su base ischemica [6].

Circa il 90% dei pazienti sclerodermici presenta interessamento esofageo, vi è infatti la riduzione o la scomparsa della peristalsi del terzo distale dell'esofago, causata da deficit nella trasmissione neuromuscolare e da una progressiva ipotonia dello sfintere esofageo inferiore. Le alterazioni esofagee si manifestano clinicamente con rigurgito, pirosi retrosternale (secondari a reflusso gastro-esofageo) e con disfagia da rallentata motilità. Tali alterazioni vengono studiate mediante esofagogastroduodenoscopia (EGDS), studio radiologico delle prime vie digestive e manometria esofagea [6].

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 ciò comporta una

manifestazione clinica [8]. Può esserci interessamento primario con cardiomiopatia di tipo restrittivo o con blocchi di conduzione e aritmie (per sostituzione del tessuto di conduzione con tessuto fibroso) o coinvolgimento cardiaco secondario dovuto a pneumopatia infiltrativa diffusa o a ipertensione arteriosa polmonare.

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. Il quadro clinico e laboratoristico è caratterizzato da un incremento notevole della pressione arteriosa (il 10% circa delle crisi renali sono però normotensive), dalla comparsa di insufficienza renale acuta, raddoppiamento dell'attività reninica plasmatica, anemia emolitica microangiopatica, piastrinopenia e insufficienza cardiaca [9].

Il coinvolgimento degli organi viscerali è un fattore importante nel determinare la prognosi: la disfunzione esofagea gravemente debilitante è la complicanza viscerale più comune e la malattia polmonare interstiziale (ILD) è la principale causa di morte [10].

Sono anche frequenti manifestazioni generali: astenia, calo ponderale, e più raramente febbre. Da un punto di vista laboratoristico sono riscontrabili alterazioni dovute all'infiammazione cronica come aumento della VES, anemia e ipergammaglobulinemia policlonale.

Nei pazienti con SSc, è stato anche osservato un aumento della suscettibilità allo sviluppo dei tumori, principalmente del polmone [9].

Fenomeno di Raynaud

L'esordio della SSc è spesso subdolo e il primo segno a comparire è nella maggior parte dei casi il fenomeno di Raynaud. Tale fenomeno è presente in circa l'80-95% dei pazienti [11].

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. Non è specifico della sclerodermia ed è infatti riscontrabile anche nel 3% della popolazione sana, più spesso in giovani donne. Nella sclerodermia la sua manifestazione è più frequentemente bifasica o trifasica: fase ischemica da vasospasmo (caratterizzata da pallore), fase cianotica, con o senza fase iperemica reattiva dovuto alla successiva rivascolarizzazione. Possono coesistere dolore, torpore e parestesie. Oltre alle dita delle mani, che rappresentano la sede più

frequentemente colpita, il fenomeno può interessare altre zone generalmente esposte, come le dita dei piedi, la punta del naso e i padiglioni auricolari.

Nel lungo periodo il fenomeno di Raynaud comporta quasi sempre la comparsa di ulcere acrali e necrosi cutanea, fino all'amputazione [12].

Varianti cliniche

Si distinguono tre forme cliniche di sclerosi sistemica: sclerosi cutanea limitata (lcSSc), sclerosi cutanea diffusa (dcSSc), sclerosi sistemica sine scleroderma [13].

La sclerosi cutanea limitata interessa prevalentemente i siti acrali in modo simmetrico e il viso. Il coinvolgimento degli organi interni avviene in modo ritardato e si manifesta clinicamente solo dopo anni o decenni. Il fenomeno di Raynaud si manifesta precocemente mentre la sclerosi cutanea periferica non prima della quarta o quinta decade di vita. Generalmente questa forma ha una prognosi migliore. Dal punto di vista sierologico si caratterizza per positività degli anticorpi anti-centromero nel 70-80% dei pazienti.

L'acronimo CREST (calcinosi, fenomeno di Raynaud, coinvolgimento esofageo, sclerodattilia e teleangectasie, tipicamente associati agli anticorpi anti-centromero) veniva utilizzato in passato, ma oggi è in parte obsoleto e non appartiene a un gruppo specifico della patologia.

La sclerosi cutanea diffusa è spesso rapidamente progressiva. La comparsa del fenomeno di Raynaud precede di poco il resto della clinica o è contemporanea ad essa. Si manifesta generalmente con edema delle dita e delle mani che si diffonde ad avambracci, braccia, viso, tronco ed estremità inferiori. Nel tempo l'edema si evolve in indurimento e fibrosi che alla fine causano deformità delle dita, che in genere mostrano contratture a flessione fissa delle articolazioni interfalangee prossimali. Il coinvolgimento degli organi interni è rapido ed esteso e tipica di questa forma è la fibrosi polmonare. Si osserva più frequentemente negli uomini. In circa il 40% dei pazienti con dcSSc sono presenti gli anticorpi anti-topoisomerasi I.

La sclerosi sistemica sine scleroderma è caratterizzata da un variabile coinvolgimento viscerale in assenza di sclerosi cutanea. In tale variante il fenomeno di Raynaud può essere più o meno presente e la sierologia immunitaria può risultare positiva sia per gli anticorpi anti-topoisomerasi I che per gli anticorpi anti-centromero [10].

1.1.3 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 coinvolgono 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: 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 [14]. 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 [15].

Recenti studi hanno individuato alcuni dei fattori di suscettibilità genetica, i loci del gene HLA mostrano l'associazione più forte, in particolare con specifici autoanticorpi (ad es. anti-topoisomerasi 1 con DPB1 * 1301, anti-fibrillarina con DRB1 * 1302).

Anche i soggetti con polimorfismi per geni che codificano per proteine implicate nella regolazione dell'immunità e dell'infiammazione, nella trascrizione, e nella scissione e riparazione del DNA risultano più suscettibili alla malattia. In particolare, si è riscontrata una prevalenza più alta di malattia rispetto alla popolazione generale in chi presenta specifici polimorfismi per i seguenti geni: CD247, TBX21, PTPN22, TNFSF4, IL23R, IL-21, C8orf13-BLK, PLD4, NLRP1, PLCL2, NFkB, IRF8, IRF4, CSK, IRAK1, TNIP1, FAS, MIF, HGF, OPN, IL-6, CXCL8, CCR6, CTGF, ITGAM, CAV1, MECP2, SOX5, PPAR- γ , XRCC1, XRCC4, GRB10 NOTCH4, RHOB, PSD3, PSOR1C1 [16].

Le modificazioni epigenetiche sono ulteriori candidate nell'eziopatogenesi della sclerodermia: l'ipometilazione di alcuni promotori favorirebbe l'espressione di molecole co-stimolatorie (come il CD70 nei linfociti T CD8+) che sembrerebbero promuovere l'autoimmunità [17].

Esiste inoltre 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 CMV, il Parvovirus B19, l'EBV e secondo studi recenti anche gli adenovirus [18]. Per gli agenti batterici invece, l'unico che sembra rilevante è l'*Helicobacter pylori* la cui incidenza pare essere circa dell'81% nei soggetti con SSc e il cui coinvolgimento sembra essere legato alla sua

capacità di stimolare la produzione della HSP 60, proteina implicata in diversi pathway proflogistici.

Nella patogenesi della sclerodermia giocano un ruolo centrale: danno endoteliale, produzione e deposizione eccessiva di collagene da parte dei fibroblasti, stress ossidativo e specie reattive dell'ossigeno (ROS), ossigenazione dei tessuti e infine autoimmunità, che riflette l'attivazione coordinata dell'immunità innata e adattativa.

Il danno endoteliale è presente sin dalle prime fasi della malattia e coinvolge il tratto microvascolare, in particolare le arteriole. Sia gli anticorpi sia le cellule effettrici potrebbero interferire con la normale proliferazione delle cellule endoteliali. Nella SSc è stata dimostrata una iperreattività immunitaria nei confronti della membrana basale, soprattutto verso il collagene IV e la laminina [19]. Inoltre, nei pazienti sclerodermici è stata dimostrata la presenza di elevate quantità di citochine potenzialmente in grado di danneggiare, direttamente o indirettamente, il microcircolo (PDGF, IL-1, IL-2, TNF- α , leucotriene B₄, endotelina 1 e TGF- β) [20]. Tra i meccanismi non immunologici di danno endoteliale è stata rivolta particolare attenzione ai radicali liberi dell'ossigeno (in particolare al perossido d'idrogeno) che 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 [21].

Per quanto riguarda l'aumentata produzione di matrice extracellulare recenti studi 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 [22]. 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 [23].

Lo stress ossidativo e gli alti livelli di ROS in quasi tutte le malattie infiammatorie sono una conseguenza diretta dell'attivazione dei mononucleati, ma nella sclerodermia, sembrano essere indipendenti dallo stato infiammatorio, infatti livelli elevati di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule mesenchimali persistono in vitro in assenza di fattori di crescita e citochine [24]. Le specie reattive dell'ossigeno originano dalla NADPH ossidasi di membrana, che viene stimolata in risposta al danno della parete dei vasi. Sono implicati nella stimolazione della NADPH ossidasi il

TGFbeta1, il PDGF, l'angiotensina 2 e la trombina. I radicali liberi hanno effetti profibrotici diretti sui fibroblasti e contribuiscono al rilascio di mediatori implicati nella fibrosi [12].

Il ruolo patogenetico del sistema immunitario nella sclerosi sistemica, secondo numerosi studi è da attribuire soprattutto ai linfociti T. Nella cute e nel liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL) dei pazienti sono presenti sia linfociti T CD4+ che linfociti T CD8+ [25]. L'attività di queste cellule potrebbe essere responsabile della fibrosi e del danno endoteliale nei pazienti con SSc, attraverso la produzione di mediatori solubili o effetti citotossici. È noto che, in condizioni normali, i linfociti Th1 producono IFN-γ e IL-2, responsabili della risposta immunitaria cellulomediata, mentre i linfociti Th2 secernono IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 che promuovono una risposta immunitaria di tipo umorale. Nella SSc è stata dimostrata una produzione citochinica prevalentemente di tipo Th2, con aumento significativo di IL-4 [26]. Lo studio del TCR ha evidenziato inoltre nei pazienti sclerodermici una restrizione oligoclonale dei linfociti T, suggerendo l'esistenza di un fattore antigenico attivatorio che potrebbe essere alla base della malattia [27].

Sembrerebbero coinvolti nella patogenesi della sclerosi sistemica anche i linfociti B. L'analisi del repertorio di cellule B circolanti in pazienti con SSc ha mostrato l'espansione del sottoinsieme di cellule B naïve (CD27-) e il concomitante declino delle cellule B della memoria e delle componenti plasmacellulari. Tuttavia, sia le cellule B naïve che quelle della memoria dei pazienti con SSc presentano sovraespressione del CD19, regolatore di risposta positiva (la perdita di espressione di CD19 attenua la fibrosi della cute 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 sulle cellule B, BAFF (fattore di attivazione delle cellule B) e APRIL (ligando che induce la proliferazione), sono aumentati nei pazienti con SSc e associati a specifiche manifestazioni cliniche come l'esteso coinvolgimento della cute e la presenza di fibrosi polmonare.

1.1.4 Autoanticorpi

La SSc è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi circolanti diretti contro diversi componenti cellulari ed extracellulari. Circa il 95% dei pazienti con SSc ha autoanticorpi rilevabili, che nella maggior parte dei casi sono altamente specifici per la malattia. Sebbene questi autoanticorpi siano correlati alla gravità della malattia e il rischio di complicazioni organo-specifiche, la loro rilevanza patogenetica è da chiarire [28].

Anticorpi anti-nucleo (ANA)

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA) risultano positivi in più del 90% dei pazienti con sclerosi sistemica e reagiscono con vari componenti intracellulari: gli anticorpi anti-centromero (ACA) e gli anticorpi anti-topoisomerasi I (anti-topo I, precedentemente anti-Scl-70) sono gli ANA più frequenti nei pazienti con SSc.

Anticorpi anti-centromero (ACA)

Il pattern di colorazione anti-centromero può essere rilevato nel 70-80% dei pazienti con sclerodermia cutanea limitata ed è associato ad un alto rischio di ipertensione polmonare, ma non di fibrosi polmonare [29, 30]. L'antigene è il cinetocore delle regioni centromeriche dei cromosomi. I pazienti positivi per ACA hanno una prognosi più favorevole, associata ad un coinvolgimento cutaneo limitato, rispetto ai pazienti con altri ANA correlati alla sclerodermia [30].

Anticorpi anti-topoisomerasi I

Gli anticorpi anti-topoisomerasi I sono presenti nel 75% dei pazienti con forma diffusa di malattia e nel 15-20% di tutti i pazienti con SSc, essi correlano con una prognosi peggiore della malattia, con una più estesa trasformazione fibrotica polmonare e con un più elevato rischio di crisi renale. Studi in vitro hanno rivelato effetti patogeni diretti di questi autoanticorpi: Henault et al. [31] hanno riferito che l'autoantigene topoisomerasi I è legato in modo specifico ai fibroblasti, dove è riconosciuto dall'anti-topo I dei pazienti con SSc. Il legame dell'anti-topo I stimola l'adesione e l'attivazione dei monociti coltivati. Anche la topoisomerasi I rilasciata dalle cellule endoteliali apoptotiche si lega in modo specifico ai fibroblasti. Pertanto, è possibile che, in vivo, la topoisomerasi I si leghi alle superfici dei fibroblasti, recluti l'anti-topo I e induca successivamente l'adesione e l'attivazione dei monociti, portando allo sviluppo di SSc.

Altri anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA)

Anticorpi anti-RNA polimerasi I, II e III sono presenti in circa il 20% dei pazienti sclerodermici, correlano con la forma diffusa della malattia, con una bassa probabilità di sviluppare fibrosi polmonare, ma con un elevato rischio di crisi renale.

Gli anticorpi anti-Th/To sono autoanticorpi specificamente diretti contro ribonucleoproteine presenti nel 2-5% dei pazienti sclerodermici e generalmente associati a sclerosi cutanea limitata.

Gli anticorpi anti-PM-Scl sono caratteristici della sindrome da overlap polimiosite-sclerosi sistemica, ma sono anche presenti nel 4-11% dei pazienti sclerodermici e sono predittivi di una forma limitata di malattia.

Anticorpi contro antigeni non nucleari

Recentemente sono stati descritti autoanticorpi contro antigeni non nucleari, come gli anticorpi contro il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR), gli anticorpi anti-cellule endoteliali (AECA), gli anticorpi contro il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R), gli anticorpi contro il recettore di tipo A dell'endotelina-1 (ETaR), gli anticorpi anti-fibroblasti (AFA) e quelli contro il recettore muscarinico-3 (M3R). Questi autoanticorpi sembrano partecipare alla patogenesi della SSc. Per alcuni di questi si sta studiando anche l'utilità diagnostica e soprattutto si stanno costruendo modelli animali che permettano la sperimentazione di farmaci atti a bloccare pathways da loro innescati.

Gli anticorpi anti-cellule endoteliali (AECA) sembrano avere un ruolo patogeno data la loro capacità di indurre l'apoptosi nelle cellule endoteliali umane. In vivo, il trasferimento di siero AECA-positivo da polli UCD-200 (un modello animale di SSc), ha indotto l'apoptosi delle cellule endoteliali in embrioni di pollo sani. È stato osservato in alcuni pazienti con SSc che lo stesso autoanticorpo lega una proteina del CMV (Citomegalovirus), facendo ipotizzare un meccanismo di mimetismo molecolare. In uno studio è stato osservato che anticorpi anti-cellule endoteliali prelevati da pazienti con SSc possono attivare cellule endoteliali, aumentandone l'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1, E-selectina, IL-6, IL-8, CCL2.

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

Gli anticorpi contro il recettore di tipo A dell'endotelina-1 (ETaR) sono stati identificati per la prima volta nel siero di pazienti con PAH. Nel siero di pazienti con SSc, gli anticorpi anti-AT1R e anti-ETaR sono stati rilevati per la prima volta da Riemekasten et al. Gli anticorpi anti-AT1R e anti-ETaR sono presenti in circa l'85% dei pazienti con SSc, mostrano cross-reattività per entrambi i recettori e si è visto che i livelli dei due anticorpi sono fortemente correlati tra loro. Elevati livelli di anticorpi anti-AT1R e anti-ETaR sono stati associati a gravi manifestazioni vascolari della SSc quali ulcere digitali e PAH. Questi autoanticorpi inducono la fosforilazione di ERK1/2 e

l'aumentata espressione del gene TGF β nelle cellule endoteliali microvascolari dermiche umane. Inoltre, aumentano la produzione di IL-8 e CCL18 in linfociti T umani periferici, linfociti B e monociti.

Topi sani C57BL-6 trattati con somministrazioni endovenose ripetute di IgG da pazienti con SSc positivi per anticorpi anti-AT1R e anti-ETaR hanno mostrato all'analisi istologica dei polmoni, eseguita mediante colorazione con ematossilina ed eosina, un ispessimento dei vasi e un'elevata densità cellulare nel tessuto interstiziale.

Gli anticorpi contro il recettore muscarinico-3 (M3R) sembrano essere maggiormente espressi nel siero di pazienti affetti da SSc con sintomi gastrointestinali, infatti fisiologicamente il recettore muscarinico-3 ha un ruolo centrale nella regolazione della motilità intestinale. Diversi studi hanno dimostrato che il trasferimento passivo di questi anticorpi in modelli murini altera gravemente l'attività mioenterica [32].

1.1.5 Diagnosi

La diagnosi di sclerosi sistemica è prevalentemente clinica: anamnesi ed esame obiettivo, supportati da indagini di laboratorio (ricerca degli autoanticorpi marcatori di malattia) ed esami strumentali (capillaroscopia ed esami specificamente atti a valutare il coinvolgimento dei vari organi interni), solo raramente si deve ricorrere alla biopsia.

Nel corso degli anni si sono sviluppati diversi criteri diagnostici, con l'obiettivo anche di uniformare i criteri per i pazienti che entravano nei trial clinici.

Nel 1981 furono presentati i primi criteri diagnostici dall'American Rheumatism Association: sclerosi cutanea prossimale alle metacarpofalangee come criterio maggiore e sclerodattilia, ulcere o cicatrici ai polpastrelli e fibrosi polmonare bibasale all'RX del torace, come criteri minori. Il problema di questi criteri è che possono essere positivi in alcuni pazienti affetti da condizioni simil-sclerodermiche e negativi in alcuni pazienti affetti da SSc, soprattutto da lcSSc.

Nel 2013 le società europee di reumatologia (EULAR), insieme a quelle americane (ACR), hanno collaborato al fine di ricercare nuovi criteri diagnostici, che si ponessero come obiettivo quello di essere più sensibili, soprattutto nelle forme limitate alla cute.

Tali criteri presentano 7 domini, di cui alcuni hanno diverse manifestazioni possibili e ognuno ha un punteggio: ispessimento della pelle delle dita (puffy finger 2, sclerosi cutanea distale alle metacarpofalangee 4), lesioni della punta delle dita (ulcere digitali della punta 2 e cicatrici digitali

3), telangiectasia 2, pattern capillaroscopico sclerodermico 2, ipertensione arteriosa polmonare e/o malattia polmonare interstiziale 2, fenomeno di Raynaud 3, anticorpi correlati alla sclerodermia 3 (anti-centromero, anti-topoisomerasi I, anti-RNA polimerasi III). Se in uno stesso dominio ci sono più manifestazioni conta solo quella con punteggio più alto. Il punteggio massimo possibile è 19 e i pazienti che hanno 9 o più punti sono classificati come aventi SSc. I criteri non devono essere applicati a pazienti con un disturbo simile alla sclerosi sistemica che spieghi meglio le loro manifestazioni (fibrosi sclerosante nefrogenica, morphea generalizzata, fascite eosinofila, scleroderma diabeticorum, scleromixedema, eritromialgia, porfiria, lichen, GVHD) e ai pazienti con ispessimento della cute che risparmia le dita. La sensibilità e specificità dei nuovi criteri è rispettivamente, 0.91 e 0.92 [28].

La diagnosi è più difficoltosa nelle fasi precoci della malattia quando la sclerosi sistemica potrebbe manifestarsi 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 questi casi la diagnosi di SSc e, di conseguenza, la terapia appropriata sono ritardate fino alla comparsa del coinvolgimento della cute e/o del coinvolgimento degli organi interni rilevabile clinicamente, quando quindi il rimodellamento microvascolare, la fibrosi dei tessuti o l'atrofia sono già irreversibili. In un recente studio di Delphi, sono stati identificati come necessari per la diagnosi precoce di SSc quattro segni/sintomi: fenomeno di Raynaud (RP), dita gonfie che si trasformano in sclerodattilia, anticorpi antinucleari e anticorpi specifici SSc (ACA e anti-topo I) e capillaroscopia con pattern sclerodermico [33].

Nei pazienti con assenza di autoanticorpi marcatori e privi di alterazioni capillaroscopiche precise non è opportuno procedere ulteriormente. Nei casi con anticorpi antinucleari a specificità non definita e/o reperti capillaroscopici aspecifici si pone la diagnosi di fenomeno di Raynaud sospetto secondario o di Connettivite Indifferenziata. Nei casi in cui, infine, risultino presenti anticorpi marcatori o reperti capillaroscopici tipici (ad esempio megacapillari e/o aree avascolari), si pone la diagnosi di SSc e bisogna indagare l'esistenza di un impegno preclinico a carico di organi interni, che è stato dimostrato nel 40% di questi pazienti. A questo scopo sono ritenute utili l'esofagotonometria, le prove di funzionalità respiratoria, e l'ecografia cardiaca, meglio se implementata con il Doppler tissutale pulsato.

1.1.6 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-sistemico, 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.

Tutti i pazienti devono osservare misure generali: mantenere la temperatura ambiente fra i 20 e i 25 gradi, coprire il tronco e le estremità, evitare traumi locali, mantenere una posizione semi-seduta durante il sonno per evitare il reflusso gastroesofageo. Per contrastare il coinvolgimento dell'apparato muscolo-scheletrico si ritiene utile, la ginnastica, la massoterapia e la chinesiterapia.

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

Le attuali linee guida per il trattamento della SSc sono quelle EULAR (European League Against Rheumatism) 2013 [34], che si pongono come aggiornamento delle precedenti linee guida del 2009 [35], queste propongono diversi approcci al trattamento della malattia, sulla base di quelle che sono le problematiche del paziente.

Per il trattamento del fenomeno di Raynaud sono raccomandati la nifedipina e gli inibitori della fosfodiesterasi di tipo 5 (PDE-5). Gli effetti collaterali dei calcioantagonisti nella SSc sono principalmente ipotensione, vertigini, arrossamento, edema e mal di testa. Gli effetti collaterali associati all'uso degli inibitori della PDE-5 sono comuni e comprendono diverse forme di reazioni vasomotorie, mialgie, reazioni allergiche, dolore toracico, dispepsia, irritabilità nasale e anomalie visive.

I calcioantagonisti di tipo diidropiridinico (solitamente la nifedipina orale) dovrebbero essere considerati come terapia di prima linea, gli inibitori della PDE-5 dovrebbero essere considerati in pazienti con manifestazione grave o che non rispondono in modo soddisfacente ai bloccanti dei canali del calcio (forza di raccomandazione: A).

L'Iloprost per via endovenosa riduce la frequenza e la gravità del fenomeno di Raynaud e dovrebbe essere preso in considerazione per le forme più gravi, quando le terapie orali (compresi i calcio-antagonisti e gli inibitori della PDE-5) sono fallite (forza di raccomandazione: A). La dose consigliata è di 0,5-3 ng / kg / min per 3-5 giorni consecutivi sequenzialmente o per via orale 50-150 µg due volte al giorno. I prostanoïdi orali sembrano essere generalmente meno efficaci.

Un piccolo studio indica che la fluoxetina potrebbe migliorare la frequenza e la gravità del fenomeno di Raynaud e quindi potrebbe essere considerata nel trattamento (forza di raccomandazione: C). Inoltre, la fluoxetina sembrerebbe essere meglio tollerata rispetto alla nifedipina. I principali effetti collaterali riportati sono apatia, letargia e concentrazione ridotta. Sono comuni anche sintomi quando si sospende il trattamento, soprattutto se la sospensione è brusca.

Per il trattamento delle ulcere digitali (DU) è indicato il trattamento con Iloprost (forza di raccomandazione: A). Considerando che i prostanoïdi orali hanno mostrato un'efficacia inferiore rispetto all'Iloprost intravenoso, quest'ultimo è maggiormente raccomandato per questa problematica. La dose consigliata per via endovenosa è di 0,5-2 ng / kg / min per 3-5 giorni consecutivi. Non c'è invece evidenza di utilità della somministrazione di prostanoïdi per la prevenzione di nuove ulcere. Nei casi più gravi, può essere utilizzata una terapia combinata con vasodilatatore orale e Iloprost per via endovenosa, tuttavia va tenuto conto dell'aumento del rischio di effetti collaterali.

Anche la nifedipina orale ha un effetto benefico sulle DU.

Gli inibitori della PDE-5 migliorano la guarigione delle DU e possono anche impedire la nuova insorgenza (forza di raccomandazione: A). Le dosi consigliate sono: sildenafil 50 mg due volte al giorno, sildenafil a rilascio modificato 100 mg / die aumentato fino a 200 mg / die o tadalafil 20 mg a giorni alterni.

Il Bosentan riduce il numero di nuove DU in pazienti con SSc e deve quindi essere preso in considerazione per la prevenzione di questa complicanza, specialmente nei pazienti con DU multiple nonostante l'uso di calcio antagonisti, inibitori della PDE-5 o terapia con ilprost (forza di raccomandazione: A). Vi sono però due principali preoccupazioni relative all'uso di bosentan e di altri antagonisti del recettore dell'endotelina: potenziali danni al fegato e teratogenicità, inoltre i contraccettivi ormonali possono non essere affidabili se co-somministrati con bosentan, poiché questo farmaco può ridurre la loro efficacia interferendo con il sistema del citocromo P450.

Per il trattamento dei pazienti sclerodermici con ipertensione polmonare è raccomandato il bosentan: migliora la resistenza all'esercizio fisico, è in grado infatti di far ottenere notevoli miglioramenti del 6-minute walk test e delle classi funzionali NYHA/WHO (New York Heart Association/World Health Organization), e migliora alcuni parametri emodinamici nei pazienti sclerodermici.

Il sildenafil (inibitore della fosfodiesterasi) è in grado di migliorare la capacità di resistenza allo sforzo fisico, la classe funzionale NYHA e alcuni parametri emodinamici, quindi anche questo farmaco potrebbe essere utilizzato per il trattamento della PAH associata a SSc. Potrebbe essere somministrato come seconda chance terapeutica in quei pazienti in cui il bosentan si è mostrato inefficace o non può essere utilizzato per ragioni di sicurezza.

L'epoprostenolo per via endovenosa è indicato per il trattamento della PAH severa, con classe NYHA III o IV. In associazione con la terapia convenzionale (diuretici, anticoagulanti orali, ossigenoterapia e glicosidi digitalici) migliora la tolleranza all'esercizio fisico, la classe funzionale e i parametri emodinamici: provoca una diminuzione statisticamente significativa delle resistenze vascolari polmonari, una diminuzione della pressione media in arteria polmonare e della pressione intra-atriale destra e inoltre determina un notevole incremento dell'indice cardiaco, ovvero del rapporto tra la gittata cardiaca e la superficie corporea.

Per il coinvolgimento cutaneo può essere utilizzato il metotrexato nelle forme precoci di sclerosi sistemica diffusa, in quanto determina effetti positivi sulla sintomatologia legata all'interessamento e all'indurimento cutaneo. Anche la ciclofosfamide, il micofenolato mofetile, l'azatioprina e la ciclosporina A si sono mostrati in grado di dare dei miglioramenti per quanto concerne l'interessamento cutaneo nei pazienti sclerodermici. I glucocorticoidi possono essere utili nelle fasi iniziali delle forme cutanee diffuse di sclerosi sistemica, in quanto riducono rigidità e dolore, ma non sono in grado di influenzare la progressione dell'interessamento cutaneo o viscerale.

La ciclofosfamide è in grado anche di limitare la progressione della pneumopatia interstiziale, inducendo una stabilizzazione e, in alcuni casi, un miglioramento delle alterazioni della funzionalità polmonare e anche un miglioramento delle alterazioni visibili alla HRCT dopo un anno di terapia [10]. Questo farmaco migliora i test di funzionalità respiratoria, la dispnea e la qualità della vita. La dose e la durata del trattamento vanno valutati attentamente e caso per caso, in base alle condizioni cliniche del paziente e alla risposta alla terapia.

Il trattamento della crisi renale sclerodermica prevede l'utilizzo degli ACE inibitori (inibitori dell'angiotensin-converting-enzyme), infatti questi sono stati associati a un significativo miglioramento della sopravvivenza.

Gli inibitori di pompa protonica (PPI) possono essere impiegati per la prevenzione del reflusso gastroesofageo, delle ulcere esofagee e delle stenosi, mentre i procinetici andrebbero utilizzati per il trattamento dei disturbi della motilità (disfagia, episodi di reflusso gastroesofageo, sensazione di ripienezza precoce dopo il pasto, sensazione di gonfiore, pseudo-ostruzioni).

Quando presente malassorbimento causato dall'iperproliferazione batterica può essere utile un trattamento con brevi cicli di antibiotici ad ampio spettro (ad esempio fluorochinoloni, amoxicillina-acido clavulanico, metronidazolo, eritromicina).

Il trattamento dell'apparato muscoloscheletrico nella SSc esula dalle attuali linee guida EULAR. I principali farmaci utilizzati sono quelli immunosoppressori (farmaci antinfiammatori non steroidei, corticosteroidi ad alto dosaggio, ciclofosfamide in associazione con steroidi, ciclosporina, metotrexate), che purtroppo mostrano una modesta o scarsa efficacia nel trattamento della sclerosi sistemica e il loro uso è razionalmente limitato alle forme di SSc caratterizzate da una forte componente flogistica, per controllare i dolori articolari, muscolari e tendinei [36]. La spiegazione della loro scarsa efficacia come terapia di fondo della sclerosi sistemica va ricercata nell'attuale concezione patogenetica della malattia: l'attivazione immunologica e la conseguente produzione di citochine e di fattori di crescita creano un circuito autocrino che si perpetua anche in assenza dello stimolo immunitario iniziale.

Per contrastare la fibrosi gli interferoni sono le sostanze dotate della maggiore efficacia nell'inibire la sintesi del collagene e la proliferazione dei fibroblasti. La lunga durata della malattia in rapporto ai loro numerosi effetti collaterali ne rendono tuttavia difficile l'impiego nella pratica clinica. Attualmente però non esistono farmaci in grado di rimuovere l'eccesso insolubile di fibre collagene.

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 e infatti non sono ancora compresi nelle linee guida EULAR.

I farmaci attualmente impiegati sono:

- inibitori del pathway infiammatorio: farmaci anti CD-20 (Rituximab), bloccanti il recettore dell'IL-6 (Tocilizumab);
- inibitori del TGF- β o altri fattori di crescita pro-fibrotici: Imatinib, Dasatinib, Nilotinib;
- modulatori di fattori epigenetici;
- trapianto di cellule staminali [37].

In ultimo considerando l'eterogeneità della SSc, la complessità della valutazione diagnostica e l'ampia gamma di opzioni di trattamento disponibili, gli esperti ritengono che dovrebbe fortemente essere preso in considerazione il riferimento dei pazienti con SSc a un centro specializzato.

1.1.7 Decorso e prognosi

Il decorso della SSc è variabile da caso a caso, soprattutto fra pazienti appartenenti a sottogruppi diversi di malattia. La sopravvivenza dalla diagnosi è del 80-90% a 5 anni e del 70-80% a 10 anni. Tuttavia, è inferiore e associato a una prognosi peggiore negli uomini e nei pazienti più anziani, mentre le donne e i pazienti più giovani presentano generalmente un punteggio di sopravvivenza più elevato e una prognosi migliore.

L'aspettativa di vita media dei pazienti con SSc è inferiore di 16-34 anni rispetto a quella dei coetanei [1] [38].

Nella dcSSc la mortalità è dovuta nella quasi totalità dei casi alla miocardiopatia, alla pneumopatia ed alla nefropatia. Nella lcSSc la complicanza più temibile è l'ipertensione arteriosa polmonare. In altri pazienti dello stesso sottogruppo la morte sopraggiunge per lo più per malassorbimento intestinale o per altre localizzazioni.

Sono fattori prognostici sfavorevoli la presenza di sclerosi cutanea diffusa, l'anemia, la proteinuria, l'aumento della velocità di eritrosedimentazione, la diminuzione della DLCO e/o l'impegno clinicamente evidente alla presentazione di rene, cuore, polmone, apparato digerente.

Al di là dell'impatto sulla durata della vita, la SSc causa anche un'alterazione importante della qualità della vita dei pazienti che ne sono affetti. A questo proposito sono da considerare, insieme con le conseguenze relative al deficit funzionale di ciascuno degli organi colpiti, i processi necrotici all'estremità che impediscono lo svolgimento di qualsivoglia attività comporti traumi alle regioni colpite, nonché le contratture in flessione delle articolazioni e la miopatia che limitano

fortemente la capacità funzionale. È stata infine segnalata una ridotta fertilità associata ad un'aumentata prevalenza di aborti spontanei, anche in assenza di anticorpi antifosfolipidi.

1.2 PDGF

Il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) è una citochina coinvolta nella guarigione delle ferite e nella fibrosi, ma ha anche un ruolo importante durante lo sviluppo embrionale, come dimostrano studi su topi knockout per questo gene. Questa citochina svolge una funzione mitogena e chemiotattica per le cellule di origine mesenchimale, è necessaria inoltre alla formazione, espansione, proliferazione e sopravvivenza dei miofibroblasti [39], infine favorisce la produzione di collagene da parte dei fibroblasti [10]. È quindi uno dei mediatori centrali delle vie coinvolte nella fibrosi [40].

Il PDGF è secreto da vari tipi di cellule come piastrine, monociti e cellule endoteliali [41]. Nella cute è secreto anche dai cheratinociti e dalle cellule di Langerhans, mentre nel polmone dalle cellule epiteliali e dai macrofagi alveolari [42]. Agisce principalmente come fattore di crescita paracrino, ma può anche essere coinvolto in anelli autocrini nei tumori e agisce localmente per stimolare diverse risposte cellulari. La sua espressione nelle cellule in coltura è dinamica e reattiva a una varietà di stimoli, tra cui ipossia, trombina, citochine e fattori di crescita.

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

passando perciò dal fenotipo migrante a quello proliferante come richiesto ad esempio nella riparazione tissutale.

Strutturalmente il PDGF è composto da un dimero di catene polipeptidiche legate da ponti disolfuro. Esistono 4 catene polipeptidiche: il PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, e PDGF-D e queste possono formare sia omodimeri che eterodimeri. Il PDGF-B è prevalentemente secreto dalle cellule endoteliali e svolge un ruolo paracrino sulle cellule muscolari lisce della parete del vaso che esprimono il recettore. Il PDGF-A è secreto dalle cellule epiteliali e ha un ruolo essenziale nella proliferazione e nel mantenimento delle cellule mesenchimali del derma.

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

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 [43].

1.2.1 Recettore del PDGF

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 creando così i siti di attacco per le diverse molecole coinvolte nella via di trasduzione intracellulare del segnale [44].

Le due diverse isoforme mappano su cromosomi diversi: il PDGFR α sul cromosoma 4 nell'uomo e sul 5 nel topo, mentre il PDGFR β sul cromosoma 5 nell'uomo e sul 18 nel topo [45], ma tra esse c'è una forte omologia, infatti sono uguali per il 44% e presentano lunghe sequenze sovrapponibili [46].

Entrambe sono composte da:

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

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 [43].

L'attivazione del recettore dà il via a diversi pathway che si estrinsecano nella proliferazione cellulare, nella chemiotassi e nella riorganizzazione dell'actina [43]. I recettori del PDGF sono strettamente regolati da una conformazione allosterica autoinibitoria che determina un'attività basale molto bassa in assenza di ligando.

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

- fosforilazione di chinasi citosoliche appartenenti alla via delle MAP chinasi, come RAS, ERK1 e ERK2, che comporta il reclutamento di fattori di trascrizione coinvolti nella crescita e nel differenziamento cellulare;
- attivazione della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K) che fosforila vari substrati tra i quali il fosfatidil-inositolo-4,5-bisfosfato (PIP2) che viene fosforilato a fosfatidil-inositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3) il quale rimane sulla membrana plasmatica ed attiva Akt libera nel citoplasma. Akt, una volta attivata, fosforila disattivando vari bersagli proteici cellulari producendo come effetto finale la promozione della riorganizzazione dell'actina e ciò favorisce la mobilità cellulare, stimola la crescita delle cellule e ne inibisce l'apoptosi;
- attivazione della fosfolipasi C (PLC) che, tramite il legame della tirosina fosforilata in posizione 1009 del PDGFR, diviene in grado di idrolizzare il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP2) in 1,2-diacilglicerolo (DAG) e in inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3). Attraverso l'attivazione della fosfochinasi C (PKC), l'enzima fosfolipasi C influenza inoltre la crescita e la mobilità cellulare;
- attivazione delle chinasi della famiglia Src che si legano tramite il loro dominio SH2 con i recettori del PDGF autofosforilati inducendo la risposta mitogenica del PDGF;
- attivazione della famiglia delle STAT. Le STAT possono essere legate al recettore del PDGF ed essere fosforilate quando questo lega il suo ligando, vengono così attivate e passano nel nucleo dove fungono da fattore di trascrizione [47].

Esistono anche modalità indipendenti dal PDGF per attivare questi recettori, è stato infatti osservato che il PDGFR α può essere stimolato da altri fattori di crescita come il VEGF. Questa modalità prevede un'attivazione protratta della forma monomerica del recettore: la persistenza del segnale è da attribuirsi a una stabilità maggiore della forma monomerica del recettore, che viene

internalizzato e degradato molto più lentamente. L'attivazione aspecifica del recettore è stata osservata per la prima volta in forme patologiche e gioca un ruolo centrale nella sopravvivenza dei fibroblasti nella vitreoretinopatia proliferativa [45].

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

Numerosi fattori inducono l'espressione del PDGFR, tra cui il TGF- β , l'estrogeno, l'interleuchina-1 α (IL-1 α), il fattore di crescita dei fibroblasti di base 2 (FGF-2), il fattore di necrosi tumorale- α e il lipopolisaccaride.

La segnalazione aberrante del PDGFR è implicata in diverse condizioni fibrotiche in cui i fibroblasti proliferano e depositano un'eccessiva matrice del tessuto connettivo, portando a cicatrici progressive e disfunzione d'organo.

1.2.2 Ruolo del PDGF nella sclerodermia

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

- topi transgenici con sovraespressione di PDGF vanno incontro a fibrosi viscerale;
- topi transgenici per il recettore PDGFR α con guadagno di funzione presentano un'iperplasia del tessuto mesenchimale. In alcuni modelli questa iperplasia è tanto importante da far morire già alla nascita questi topi [46];
- la presenza di anticorpi stimolanti il PDGFR nel siero di pazienti con sclerodermia;
- la forte stimolazione da parte del PDGF alla transizione dei periciti in fibroblasti;
- gli effetti benefici degli inibitori selettivi della segnalazione del PDGF sulla fibrosi del derma [12];
- la presenza di alti livelli di PDGF e del suo recettore beta nelle lesioni cutanee e nei lavaggi broncoalveolari dei pazienti [47] e nei fibroblasti [48];
- iniezioni di PDGF-B in modelli animali di fibrosi, come quello con uso della bleomicina, peggiorano la fibrosi [49].

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 sulla patologia:

- il signalling del PDGF sembra lavorare in sinergia con quello del TGF- β nello sviluppo della fibrosi [50];
- a differenza dei normali fibroblasti quelli della sclerodermia rispondono al TGF- β con una iperespressione del PDGFR α [51];
- è stato dimostrato che attraverso il PDGFR si ha l'attivazione di ERK1/2 e la 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 [24];
- l'infiammazione che si verifica, soprattutto nelle prime fasi della sclerodermia, può aumentare l'espressione del PDGFR nei fibroblasti tramite aumento delle citochine [50];
- è anche ipotizzabile che il PDGF abbia un ruolo nella vasculopatia e nell'occlusione vascolare, infatti nei periciti dei pazienti sclerodermici si trova una sovr'espressione del PDGF β . È da notare che ciò avviene anche nei periciti dei vasi linfatici e che anche questi vanno incontro a rarefazione nella SSc;
- l'Imatinib tramite l'inibizione delle tirosin-chinasi tra cui il PDGFR riduce la fibrosi nel modello murino di fibrosi che usa la bleomicina, riduce anche la proliferazione e la produzione di matrice nei fibroblasti prelevati da cute di pazienti sclerodermici. Trial clinici su pazienti sclerodermici con questo farmaco hanno dimostrato un miglioramento della funzionalità polmonare e della fibrosi cutanea, però spesso il trattamento è risultato poco tollerabile [42];
- è stato osservato che topi transgenici per il gene PDGFR β con guadagno di funzione sviluppano una complessa condizione infiammatoria, ciò può far ipotizzare che questo signalling possa essere coinvolto anche nella SSC [52] [42];
- il PDGF-C prodotto da macrofagi M2 induce l'espressione di alfa-SMA in fibroblasti dermici in vitro e potrebbe anche promuovere la differenziazione in miofibroblasto nella fibrosi cutanea. I siRNA che silenziano l'espressione di PDGFR α , inibiscono la transdifferenziazione dei fibroblasti [53] [54].

1.2.3 Anticorpi contro il recettore del PDGF

Recenti studi hanno rilevato e isolato autoanticorpi stimolatori che legano il PDGFR α nel siero dei pazienti affetti da sclerodermia [55].

Questi anticorpi agonisti del PDGFR 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 3). L'attivazione di questa cascata di segnalazione provoca infine uno stress ossidativo diffuso. Ciò porterebbe i fibroblasti all'acquisizione di un fenotipo miofibroblastico che potrebbe spiegare la risposta profibrotica persistente con formazione di focolai d'infiammazione e diffusione della trasformazione fibrotica del tessuto connettivo [40].

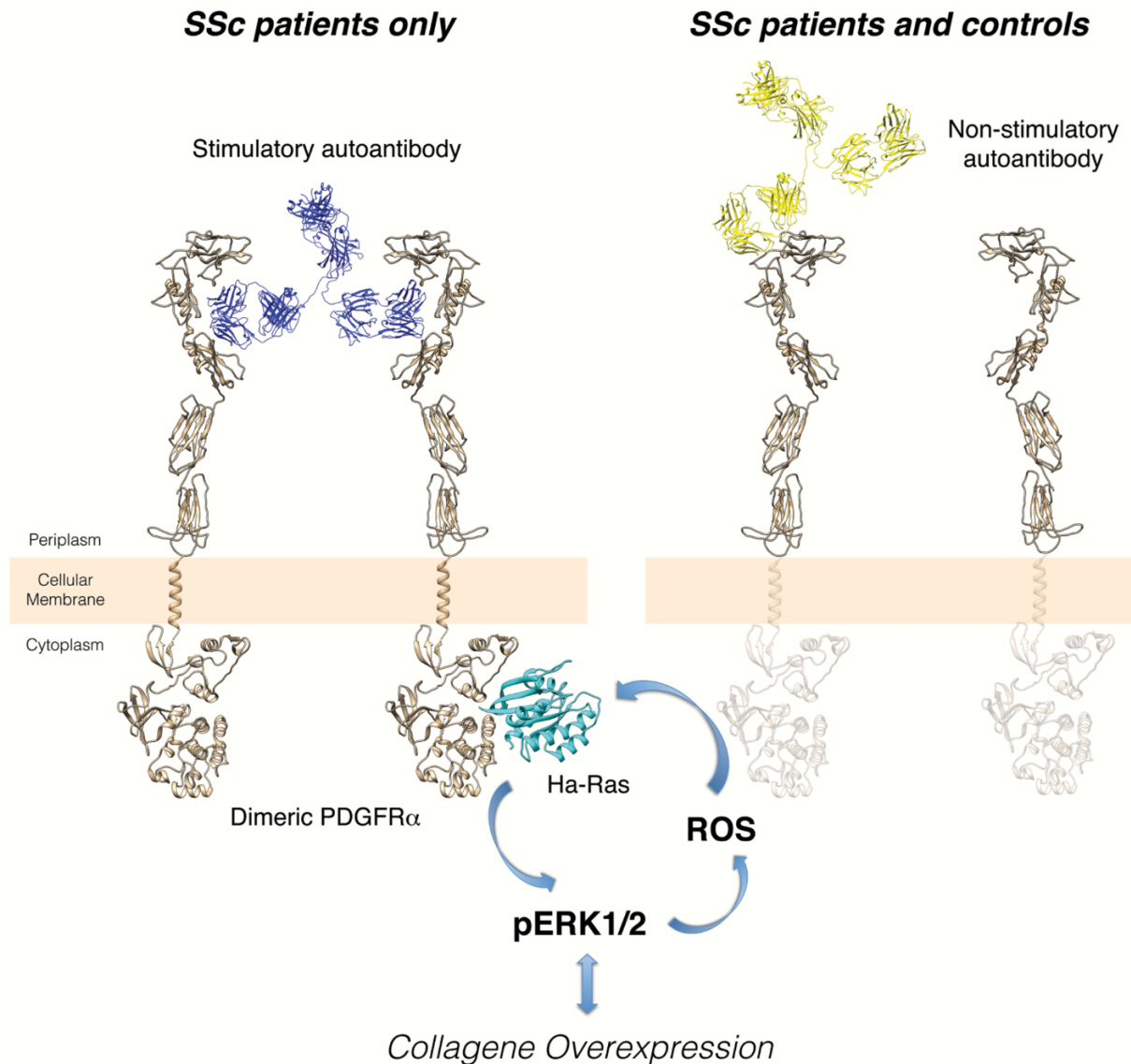


Figura 3. Epitopi di autoanticorpi anti-PDGFR α stimolatori e non stimolatori.

A sinistra: l'autoanticorpo stimolatorio clonato dalle cellule B della memoria di un paziente con SSc lega un epitopo conformazionale discontinuo del dominio extracellulare del PDGFR α , determinando la dimerizzazione del recettore e la successiva attivazione di un circuito di segnalazione intracellulare che coinvolge Ha-Ras, pERK e ROS, inducendo la sovraespressione del gene del collagene. Ciò evidenzia l'importanza di questa regione di PDGFR α come fattore scatenante la produzione di collagene nei fibroblasti e identifica possibili strategie per bloccare l'eccessiva produzione di collagene in condizioni patologiche come la SSc.

A destra: l'autoanticorpo non stimolatorio clonato da cellule B della memoria dello stesso paziente con SSc lega un singolo epitopo lineare del dominio extracellulare del PDGFR α , senza successiva dimerizzazione del recettore. Questo tipo di autoanticorpo "innocente" può riflettere la cosiddetta autoimmunità naturale, che può essere trovata in molti individui sani e che non ha alcun ruolo apparente né fisiologico né patologico [56].

1.2.4 Autoanticorpi monoclonali umani ricombinanti anti-PDGFR α

Al fine di confermare la presenza di autoanticorpi anti-PDGFR stimolatori nella SSc, il repertorio immunitario di un paziente con SSc è stato studiato direttamente da Moroncini et al. [57].

Le cellule B della memoria positive per CD22 sono state purificate mediante selezione magnetica da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ottenute da un paziente con SSc diffusa; queste cellule (indicate come cellule PAM B) sono state immortalizzate utilizzando il virus Epstein-Barr, seminate mediante Limiting dilution in piastre da 96 pozzetti e i supernatanti di 2.000 pozzetti sono stati sottoposti a screening per la presenza di IgG anti-PDGFR α .

In seguito è stato estratto da ciascun clone di cellule B anti-PDGFR-positivo l'RNA totale, retrotrascritto e amplificato per analizzare il repertorio genico delle IgG umane. Il cDNA delle catene pesanti e leggere identificate è stato clonato in un vettore di espressione e trasferito in cellule CHO per produrre 3 anticorpi monoclonali umani.

Si è poi dimostrato che questi tre mAb differiscono solo nella regione variabile delle catene leggere e hanno affinità di legame e attività funzionali distinte [58] [59].

L'uso di una grande libreria peptidica conformazionale del PDGFR α ha permesso il riconoscimento degli epitopi legati da questi anticorpi (Figura 4):

- il mAb VH_{PAM}-VK16F4, un anticorpo capace sia di legare che di stimolare il PDGFR, con produzione di ROS e aumento della trascrizione di geni per il collagene I, riconosce un epitopo del PDGFR α umano sovrapponibile a quello del PDGF-BB, un epitopo discontinuo all'interno del secondo e del terzo dominio extracellulare;
- il mAb VH_{PAM}-V λ 16F4, anticorpo 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}-VK13B8;
- il mAb VH_{PAM}-VK13B8, anticorpo capace di legare il recettore ma privo di attività stimolatoria, riconosce una sequenza lineare amminoacidica nel primo dominio extracellulare del PDGFR α .

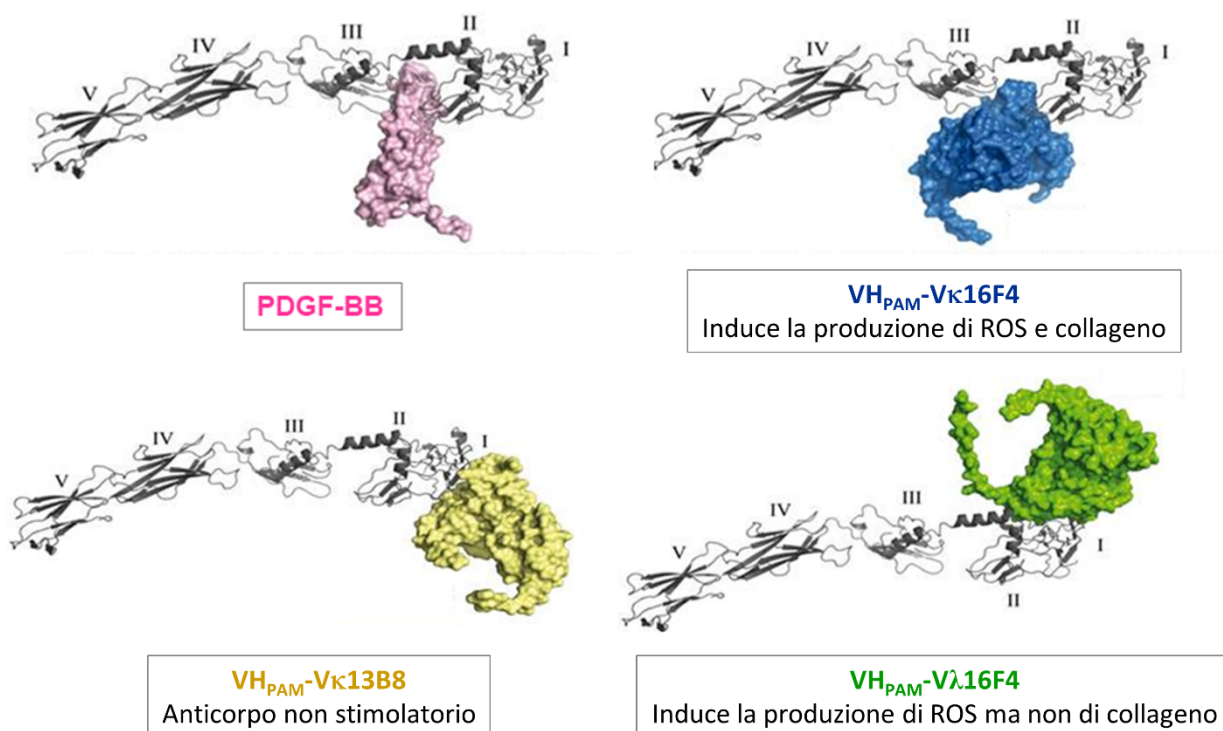


Figura 4. Mappatura degli epitopi del PDGFR α umano

I modelli del docking molecolare mostrano il legame del PDGF-BB (A) monomero o dei frammenti Fab del mAb umano ricombinante VH_{PAM}-Vκ16F4 (B), del VH_{PAM}-Vκ13B8 (C) e del VH_{PAM}-Vλ16F4 (D) alla regione extracellulare del PDGFR α monomero, che comprende i 5 domini Ig-like (etichettati I–V dalla regione N terminale alla C terminale).

Il mAb VHPAM-Vλ13B8 è risultato incapace sia di legare che di stimolare il PDGFR [57].

Per rilevare gli autoanticorpi anti-PDGFR nel siero dei pazienti con SSc sono stati validati tre test, di cui un test ELISA atto a rilevare tutti gli anticorpi anti-PDGFR. Tramite quest'ultimo test si è osservato che in 66 su 70 pazienti con SSc (94,3%) e in 63 su 130 controlli sani (48,5%) vengono riscontrati anticorpi anti-PDGFR α . Gli anticorpi sierici VH_{PAM}-Vκ16F4 sono stati trovati in 24 su 34 pazienti con SSc, ma non in controlli sani.

È importante sottolineare che le IgG purificate dal siero di 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 gli anticorpi anti-PDGFR α diretti verso epitopi non stimolatori possono essere presenti anche nei controlli sani, mentre gli anticorpi anti-PDGFR α diretti verso epitopi stimolatori sono specifici per SSc [57].

Per dimostrare l'attività in vivo di questi autoanticorpi si è attuato uno studio clinico che ha coinvolto pazienti con SSc con grave fibrosi cutanea, che non rispondevano alle terapie immunosoppressive canoniche, e che sono stati trattati con 375 mg/m² a settimana di rituximab per un totale di quattro dosi. La buona risposta clinica, osservata in tutti i pazienti e valutata come riduzione del punteggio cutaneo e miglioramento degli indici di disabilità, è stata accompagnata da una significativa riduzione dell'attività dei loro anticorpi nello stimolare la produzione di ROS e collagene di tipo I in vitro nei fibroblasti derivati da biopsie cutanee. In questo studio si è dimostrato 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 [59].

Le proprietà fibrotiche degli anticorpi agonisti anti-PDGFR sono state poi dimostrate in vivo usando cute umana bioingegnerizzata. Sono stati prelevati cheratinociti e fibroblasti da biopsie cutanee di pazienti sani, si è poi ricostruita una cute tridimensionale bioingegnerizzata che è stata innestata sul dorso di topi SCID. Il derma degli innesti cutanei è stato quindi iniettato con IgG totali purificate dal siero di pazienti con SSc o da controlli sani, e sia con l'anticorpo monoclonale anti-PDGFR α stimolatorio, che induce il collagene, sia con quello non agonista. Solo con le IgG dei pazienti malati e con l'anticorpo monoclonale anti-PDGFR α agonista si è osservata la comparsa di un fenotipo di sclerodermia, come confermato dall'aumentata deposizione di collagene e dai marker di attivazione dei fibroblasti [60].

Gli autoanticorpi anti-PDGFR α agonisti non contribuiscono solo allo sviluppo di lesioni fibrotiche nei pazienti sclerodermici, ma sembrano essere coinvolti anche nel danno vascolare della SSc e nella grave complicanza dell'ipertensione arteriosa polmonare [33].

Questo è stato recentemente dimostrato sulle cellule muscolari lisce dell'arteria polmonare umana (HPASMC) che sono state esposte all'autoanticorpo monoclonale ricombinato umano anti-PDGFR VH_{PAM}-Vk16F4 e all'anticorpo VH_{PAM}-Vk13B8. Le HPASMC hanno acquisito un fenotipo caratterizzato da un più alto tasso di crescita, attività migratoria, espressione genica della catena $\alpha 1$ del collagene di tipo I solo quando stimulate con PDGF e autoanticorpi contro il recettore del PDGF, e non quando esposte alle IgG di pazienti sani.

Gli autoanticorpi agiscono mediante l'aumento della generazione di specie reattive dell'ossigeno e dall'espressione di NOX4 che codifica per NADPH ossidasi-4 e mTORC1, bersaglio nei mammiferi della rapamicina, l'ultimo come effettore a valle nelle HPASMC stimulate [61].

1.3 Modelli murini di sclerodermia

I modelli animali forniscono sia una base sulla quale fare sperimentazione farmacologica, sia uno spunto per studiare o confermare i ruoli di diverse pathway nella patogenesi delle malattie, per questa ragione sono stati sviluppati negli anni più di venti diversi modelli di topi per SSc, ognuno dei quali ricorda almeno un segno distintivo di SSc. Ciò nonostante, nessuno dei modelli sviluppati fino ad ora comprende tutte le caratteristiche della patologia umana.

Attualmente per la sclerodermia possiamo identificare due gruppi di modelli: quello dei modelli inducibili e quello dei modelli spontanei.

Nei modelli spontanei i topi sviluppano malattie a causa di mutazioni o modificazioni genetiche senza ulteriori manipolazioni sperimentali. 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 Fli1 agisce come potente repressore del gene del collagene di tipo 1 e quindi regola la fibrogenesi. Rispetto ai controlli sani, il livello di Fli1 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 Fli1 potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi della SSc.

I topi con delezione omozigote del dominio di attivazione trascrizionale C-terminale del gene Fli1 sono vitali e sviluppano una fibrosi prominente della cute. Sopprimendo anche il gene Klf5 (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 Fli1, sono stati generati e studiati topi knockout per il gene Fli1 specifici per alcune linee cellulari [62].

- Topi con deficit di uPAR. Il recettore per l'attivatore di tipo urochinasico 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 [63].

- Topi Knock out 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 d'invecchiamento. L'attivazione di SIRT3 è implicata nella lotta allo stress ossidativo, nella difesa delle cellule contro l'apoptosi e nella prevenzione dell'invecchiamento cellulare. Dosando l'espressione di SIRT3 nella cute 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: questi topi sviluppano fibrosi del polmone, cuore e rene.
- Topi con iperespressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Il VEGF è una potente molecola proangiogenica. Nei sieri e nelle biopsie cutanee nei pazienti con SSc i livelli di VEGF sono fortemente aumentati. Topi transgenici che sovraesprimono VEGF, sviluppano spontaneamente una significativa fibrosi cutanea e una vasculopatia proliferativa, due caratteristiche tipiche della sclerodermia. Inoltre, dati derivati da esperimenti in vitro suggeriscono che il VEGF agisca come molecola profibrotica tramite l'attivazione diretta dei fibroblasti.
- 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. I topi Knock out (per fibroblasti) per il gene PTEN sviluppano fibrosi cutanea e polmonare, simile alla fibrosi dei pazienti con SSc, anche in assenza di stimoli nocivi [62].
- 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 mostra un fenotipo simile al Tsk-1, questo modello però è basato sulla mutazione del gene $\alpha 1$ del collagene 3 (Col31a) presente sul cromosoma 1. Questi ceppi, originariamente identificati aventi queste mutazioni spontanee, mostrano una cute ampiamente ispessita che si sviluppa durante la prima settimana postnatale e successivamente una patologia polmonare.. Tuttavia, a differenza della SSc, la fibrosi cutanea si verifica nell'ipoderma e il coinvolgimento polmonare è caratterizzato da alterazioni simili all'enfisema con poca fibrosi.

- Topi transgenici per Fra2 (Fos-related-antigen 2). Fra2 è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione AP-1 ed è sovraespresso nelle cellule endoteliali (EC) e nelle cellule muscolari lisce vascolari (vSMC) della cute e dei polmoni dei pazienti con SSc. I topi con sovraespressione transgenica di Fra2 ricalcano le principali manifestazioni vascolari e fibrotiche della SSc: sviluppano occlusione arteriosa polmonare e fibrosi polmonare all'età di 12 settimane [64].
- Topi con deficit di Caveolina-1 (cav-1). La perdita di cav1, il gene che codifica 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 del 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.
- Modello murino di iperespressione transgenica specifica nei fibroblasti 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 del TGF- β e modula parzialmente gli effetti pro-fibrotici del TGF- β . Questo modello di topi transgenici mostra una fibrosi tissutale accelerata che colpisce la cute, i polmoni e i reni. Inoltre questi topi imitano alcuni aspetti della vasculopatia da SSc, con progressiva obliterazione dei vasi sanguigni [65].
- Topi transgenici per Wnt-10b. È noto che la via di segnalazione Wnt ha 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 [66].

Il secondo gruppo è quello dei modelli inducibili, in cui la malattia è indotta da immunizzazione, trasferimento di componenti autoimmuni o fattori ambientali. Tra questi troviamo:

- 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 il principale

evento avverso nel trattamento del tumore nell'uomo con la bleomicina è la fibrosi. 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

I meccanismi che portano a lesione dei tessuti e a fibrosi in questo modello sono complessi e sembrano coinvolgere diverse varietà di mediatori profibrotici tra cui anche i pathway delle cellule staminali Wnt, Notch, Hedgehog; il TGF- β , l'inflammosoma, l'IL-1 e l'IL-6. Il modello murino di fibrosi cutanea indotta da bleomicina è stato ampiamente utilizzato per esplorare le terapie per la SSc per la fase infiammatoria e fibrotica della malattia. Il principale limite di questo modello animale è che la fibrosi è effetto quasi esclusivo di un processo infiammatorio conseguente ai danni dati dalla bleomicina, perciò qualsiasi farmaco con effetto antinfiammatorio interferisce con lo sviluppo della fibrosi se dato nella prima fase. Per testare quindi l'effetto anti-fibrotico di un farmaco con potenziale antinfiammatorio, si raccomanda di iniziare l'agente terapeutico dopo la fase infiammatoria. Il principale pregio invece è la facilità d'uso di questo modello [67].

- 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 idrossilici porta ad una maggiore sintesi di collagene nella cute e nel tessuto polmonare e determina la formazione di anticorpi anti-DNA topoisomerasi 1.
- Modello murino di GvHD cronica. 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 . È noto che il TGF- β è un mediatore profibrotico: l'incubazione di fibroblasti normali con il TGF- β induce un fenotipo profibrotico simil-sclerodermico. Modelli murini che esprimono una forma mutata, costitutivamente attiva del recettore TGF- β mostrano grave fibrosi cutanea e anomalie in più organi [68].
- 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. Visto il ruolo nella patologia di questi autoanticorpi

Yoshizaki e colleghi hanno immunizzato i topi con la DNA topoisomerasi 1 ricombinante umana sviluppando così negli animali fibrosi tissutale nella cute e nel polmone, infiltrazione infiammatoria e apoptosi epiteliale alveolare.

- 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. Le cuti ricostruite con cellule di pazienti sani sono state trattate con iniezioni intradermiche di IgG di pazienti con sclerodermia per replicare il fenotipo sclerodermico. Sono stati somministrati anche 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 [62].

1.4 Nuovo modello murino di fibrosi cutanea

Poiché il recettore del PDGF è stato identificato come uno dei bersagli della risposta autoimmune in corso di sclerosi sistemica [55] ed è stato dimostrato che anticorpi monoclonali umani anti-PDGFR α clonati dai linfociti B della 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 *ex vivo* su porzioni di cute umana bioingegnerizzata trapiantate sulla schiena di topi SCID [60] [61]. Sulla base di queste evidenze, sono stati esplorati e caratterizzati anche *in vivo* i meccanismi patogenetici attraverso i quali tali autoanticorpi contribuiscono alla fibrosi tipica della malattia. È stato quindi ottenuto un nuovo modello murino di sclerodermia, mediante 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 [69].

1.4.1 Generazione del topo transgenico per il PDGFR α umano

L'allineamento tra il PDGFR α umano e murino ha rivelato che a livello di motivi critici costituenti l'epitopo discontinuo dell'anticorpo monoclonale stimolatorio sono presenti singole mutazioni puntiformi determinanti per il legame degli anticorpi monoclonali al solo recettore umano. Da qui l'importanza di costituire un topo transgenico per il PDGFR α umano.

Per la generazione del topo transgenico, 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 (Figura 5). 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 identificati mediante PCR e 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 sono così ottenuti 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.

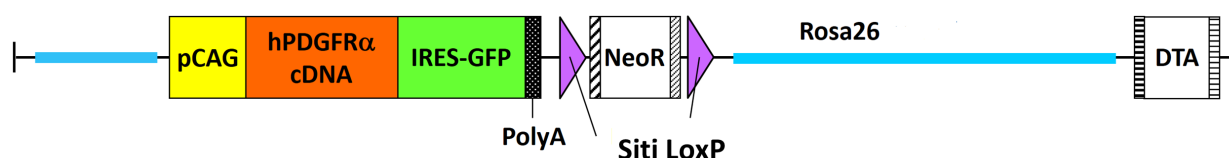


Figura 5. Vettore knock-in Rosa26-hPDGFR α .

L'intera sequenza cDNA dello hPDGFR α è stata inserita nel locus Rosa26 ubiquitariamente espresso sul cromosoma 6 murino. Nel vettore di targeting Rosa26 il cDNA dello hPDGFR α è stato clonato a valle del promotore forte CAG sintetico e seguito da una sequenza di poliadenilazione (PolyA). Inoltre, hPDGFR α è stato collegato attraverso una sequenza IRES al gene della proteina fluorescente verde (GFP), come reporter per l'espressione del transgene. Il vettore knock-in contiene anche una cassetta di espressione affiancata da sequenze loxP con un marcatore selettivo per la neomicina (NeoR) e una cassetta di espressione della tossina difterica (DTA) per la selezione negativa delle cellule staminali embrionali.

Topi transgenici, sia adulti che nuovi nati, sono stati monitorati quotidianamente per rilevare precocemente qualsiasi sintomo di sofferenza o dolore. Inoltre, coorti di topi sono state osservate nel tempo per valutare la vitalità e il benessere degli animali. I topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α risultavano sani, fertili e non presentavano alcuna apparente anomalia dello sviluppo o caratteristiche patologiche.

Tutti gli animali hanno raggiunto dimensioni e peso normali e non hanno rivelato alcun cambiamento nella morfologia rispetto ai topi wild type C57BL/6 [70].

Le curve di sopravvivenza dei topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α , ottenute utilizzando il metodo Kaplan-Meier, erano paragonabili a quelle ottenute da topi wild type C57BL/6 senza riduzione significativa della sopravvivenza mediana [71, 72].

La genotipizzazione dei topi è stata eseguita mediante quattro reazioni di PCR eseguite sul DNA genomico estratto da biopsie della coda del topo in grado di amplificare specificamente quattro diverse regioni dell'allele knock-in.

Mediante questa genotipizzazione si è dimostrato che il transgene PDGFR umano è stato ereditato stabilmente attraverso le diverse generazioni di topi, con una velocità di trasmissione alla progenie di circa il 50%.

Inoltre, al fine di confermare l'effettiva espressione del transgene nei tessuti murini, è stato valutato il numero di copie del PDGFR α umano mediante real-time PCR quantitativa dell'mRNA estratto da biopsie cutanee e polmonari di topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α .

I dati hanno dimostrato livelli di espressione simili di PDGFR α umano in tutti gli animali a livello della cute, con un intervallo di rilevamento massimo nella curva standard di ordine di grandezza da 10^3 a 10^4 copie/ul cDNA per campione [73] (Figura 6).

Parallelamente l'analisi Western blot dei lisati cutanei ottenuti dai topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α ha mostrato livelli proteici simili di PDGFR α umano in tutti i campioni testati.

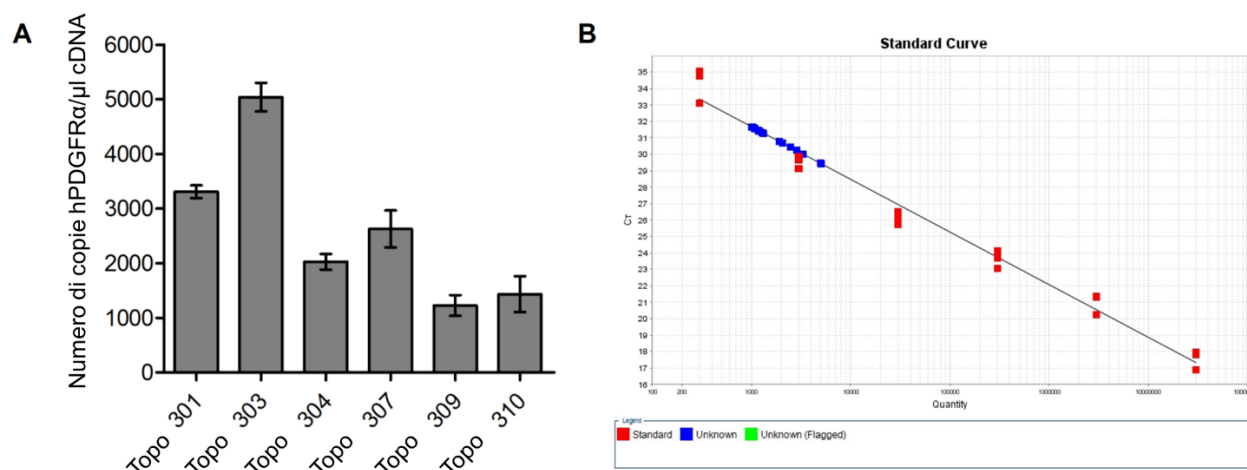


Figura 6. (A) Analisi, mediante real-time PCR quantitativa, dell'espressione del PDGFR α umano nel mRNA ottenuto da biopsie cutanee di topi C57BL/6-hPDGFR α . Sono stati rilevati numeri di copie simili, all'interno di un range massimo di un ordine di grandezza in riferimento alla curva standard (B).

1.4.2 Induzione di fibrosi cutanea mediante iniezione intradermica di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano

Sono stati impiegati topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α eterozigoti di età compresa tra dodici e sedici settimane. Sono stati selezionati solo topi maschi, date le notevoli differenze di genere nell'estensione e nella gravità della fibrosi tissutale [74, 75]. Topi C57BL/6 wild type (Charles River Laboratories) corrispondenti per età e sesso sono stati usati come controlli negativi. Al fine di indurre la fibrosi, i topi sono stati sottoposti ad iniezione intradermica, nei giorni 0, 3, 6 e 9 (Figura 7A) di anticorpo monoclonale anti-PDGFR α umano (mab) stimolatorio VH_{PAM}-V κ 16F4 [57, 60] oppure di IgG purificate dal siero di pazienti affetti da sclerosi sistemica (SSc IgG). Gli animali di controllo hanno ricevuto iniezione intradermica di una dose uguale di anti-PDGFR α mab umano non stimolatorio VH_{PAM}-V κ 13B8 [57, 60] o di IgG purificate dal siero di controlli sani (HC IgG). Come controllo della soluzione veicolo, un ulteriore gruppo di animali è stato trattato con un volume equivalente di PBS. Ad ogni *time point* i topi sono stati sottoposti ad iniezione in quattro diverse aree della cute del dorso, leggermente posteriori alle scapole, su entrambi i lati della colonna vertebrale (Figura 7B). Gli animali sono stati sacrificati 14 giorni dopo la prima iniezione intradermica mediante inalazione di isoflurano. Al momento del sacrificio sono stati campionati cute e polmone per successive analisi molecolari ed istologiche [76].

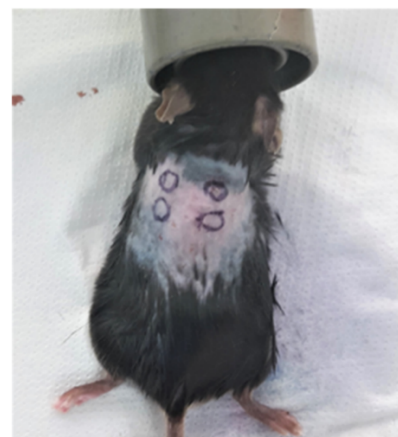
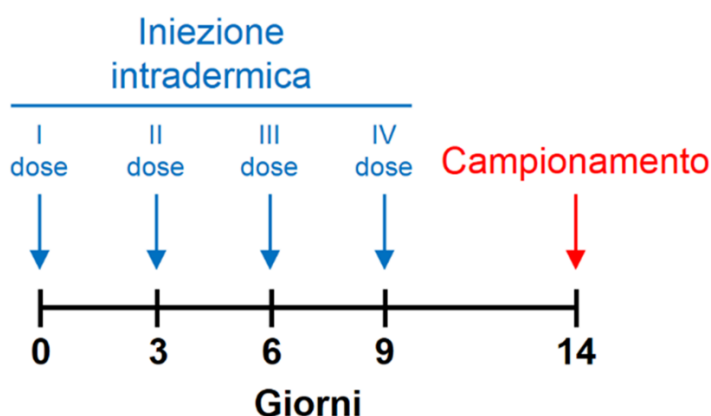


Figura 7. (A) Schema del modello sperimentale. Al fine di indurre la fibrosi cutanea, i topi sono stati sottoposti a ripetute iniezioni intradermiche, nei giorni 0, 3, 6 e 9, e sono stati sacrificati il giorno 14. **(B)** Ad ogni momento, i topi sono stati iniettati in quattro diverse aree ($\sim 1 \text{ cm}^2$ ciascuno) del dorso.

L'analisi istologica dei tessuti della cute dei topi trattati con anticorpo monoclonale anti-PDGFR α umano stimolatorio VH_{PAM}-VK16F4 oppure IgG di pazienti affetti da SSc ha documentato un marcato ispessimento cutaneo con una maggiore deposizione di fasci di collagene densamente impaccati e disposti in modo irregolare, rispetto ai topi trattati con PBS. Inoltre, gli strati di tessuto adiposo ghiandolare e sottocutaneo sono risultati ridotti e parzialmente sostituiti dall'infiltrazione di fibre collagene [77, 78]. Al contrario, l'iniezione intradermica sia di mab non stimolatorio anti-PDGFR α VH_{PAM}-VK13B8 sia di IgG purificate dal siero di controlli sani non ha prodotto alcun cambiamento nella cute. È interessante notare che tutti i topi C57BL/6 wild type ($n = 8/\text{gruppo}$) trattati con gli stessi reagenti hanno dimostrato un'istologia cutanea normale.

I risultati ottenuti dall'analisi istologica dei tessuti sono stati confermati anche dall'analisi molecolare dell'mRNA estratto dalla cute eseguita mediante real-time PCR del gene del collagene Col1A1. Tutti i topi C57BL/6 wild type trattati con le stesse sostanze hanno mostrato livelli basali di espressione del gene Col1A1 (Figura 8).

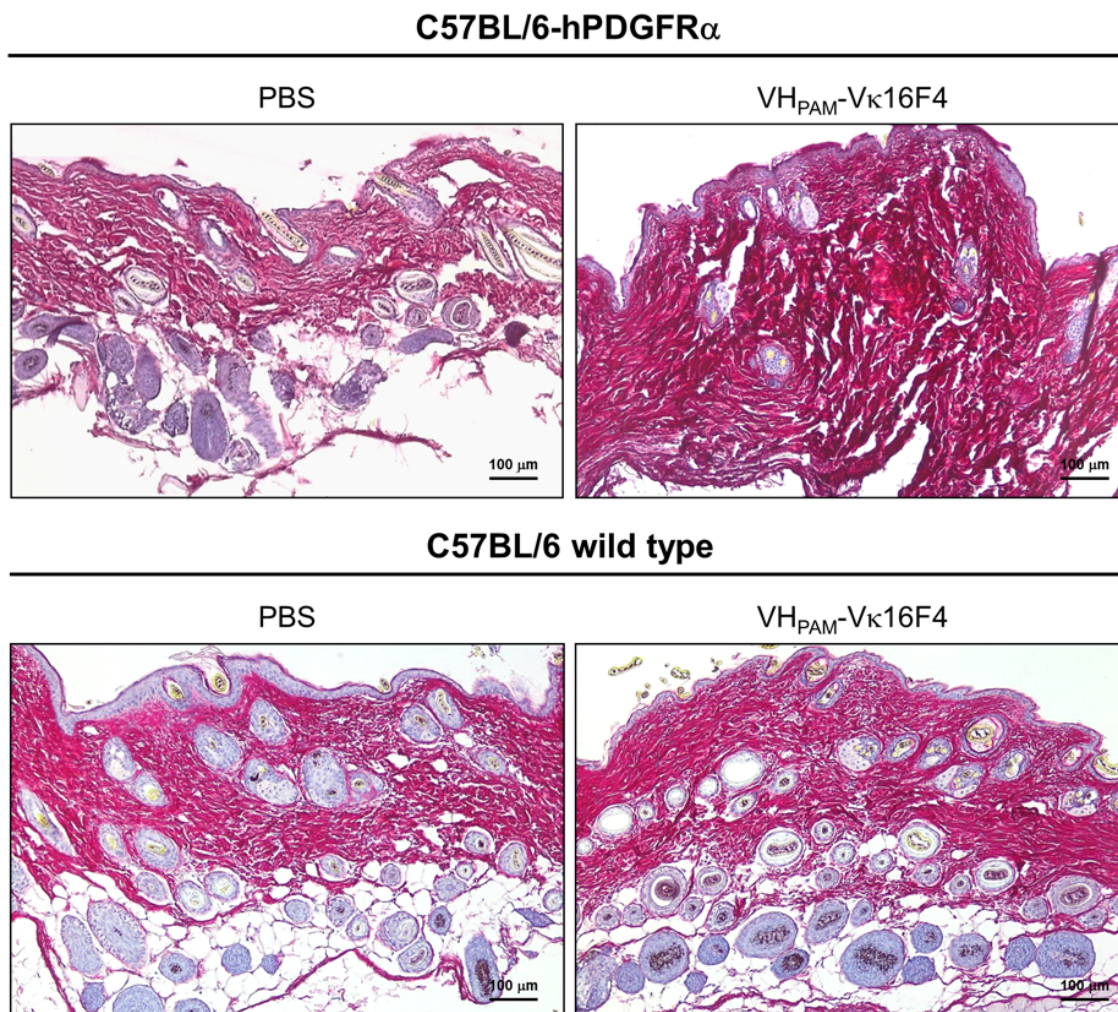


Figura 8. Colorazione Picrosirius Red delle sezioni cutanee ottenuta al giorno 14 da topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α (n=8 per gruppo). L'iniezione intradermica di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-IgG umani stimolatori ha determinato un ispessimento cutaneo rispetto al controllo del veicolo (PBS). L'iniezione intradermica di SSc-Mab VH_{PAM}-V κ 16F4 umani stimolatori non ha indotto cambiamenti significativi nel tessuto cutaneo rispetto al controllo del veicolo (PBS). Sono mostrate immagini microscopiche rappresentative (ingrandimento 10X).

I dati ottenuti confermano quindi che gli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano presentano una attività pro-fibrotica oltre che in vitro, anche in vivo. Tale attività pro-fibrotica risulta inoltre specificamente legata alla presenza del recettore umano, in quanto la fibrosi cutanea non è stata indotta nei topi appartenenti al ceppo wild type C57BL/6, dotati del solo PDGFR α murino.

2. SCOPO DELLA RICERCA

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia autoimmune cronica devastante con un forte impatto sulla qualità e sulle aspettative di vita dei pazienti, finora priva di una terapia in grado di determinarne la remissione completa.

Considerando che l'autoimmunità gioca un ruolo centrale nella patogenesi della sclerodermia, diversi studi si sono focalizzati sui mediatori immunologici, tra cui in particolare il recettore del PDGF [55].

È stato dimostrato che gli anticorpi monoclonali umani anti-PDGFR α clonati dai linfociti B della memoria dei pazienti con SSC sono in grado di indurre un aumento della trascrizione del gene del collagene sia in vitro che in vivo [60, 61].

Mediante iniezione intradermica di tali anticorpi monoclonali in topi geneticamente modificati C57BL/6-hPDGFR α è stato generato un nuovo modello sperimentale di sclerodermia. Tale modello si è rivelato uno strumento assai 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 quindi quello di esplorare una via alternativa di somministrazione degli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano, in particolare la somministrazione sottocutanea continua. Tale sperimentazione è finalizzata ad indurre nel topo la fibrosi anche di altri organi target, in particolare la fibrosi polmonare, così da ottenere un modello animale di sclerodermia che possa riprodurre gli aspetti sistemici della malattia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Genotipizzazione

La genotipizzazione dei topi è stata eseguita mediante PCR sul DNA genomico estratto da biopsie delle code dei topi, utilizzando il Kit KAPA Mouse Genotyping (KAPA Biosystems) e secondo le istruzioni del produttore. Per confermare la corretta presenza genetica dell'intera cassetta di espressione del PDGFR α umano sono state disegnate quattro coppie di primer in grado di amplificare specificamente quattro diverse regioni dell'allele knock-in (Figura 9):

Regione1 forward 5'-GTTCGGCTTCTGGCGTGTGA-3'; Regione1 reverse, 5'-AAGCTGGCAGAGGATTAGGCTCA-3';

Regione2 forward, 5'-TCTGAGTTGTTATCAGTAAGGGAGCT-3'; Regione2 reverse, 5'-TGTCGCAAATTAAGTGTGAATCAT-3';

Regione3 forward, 5'-GAACAGACACAGCTCGCAGACCTC-3'; Regione3 reverse, 5'-AACGCACACCGGCCTTATTCCA-3';

Regione4 forward, 5'-ATCACATGGTCCTGCTGGAGTTC-3'; Regione4 reverse, 5'-GGATATGAAGTACTGGGCTCTT-3'.

Un'ulteriore coppia di primer è stata utilizzata per amplificare l'allele Rosa26 wild type (ovvero per distinguere tra topi transgenici eterozigoti e omozigoti):

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

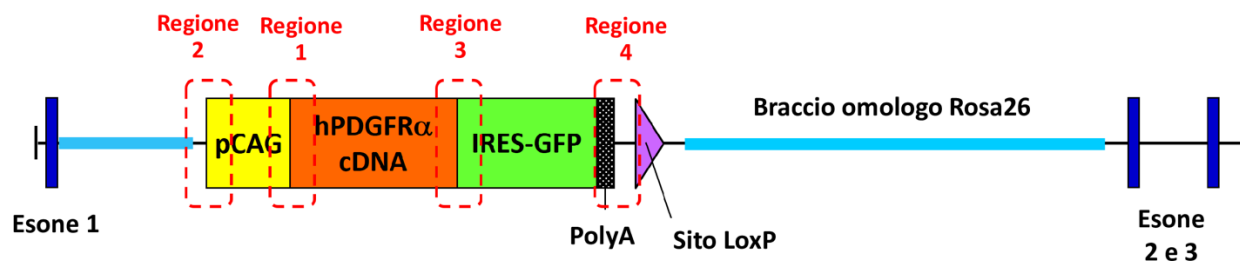


Figura 9. Schema della strategia di genotipizzazione del topo. Coppie di primer specifiche progettate per amplificare quattro diverse regioni (regione 1, 2, 3, 4 contrassegnate con una linea tratteggiata rossa) dell'allele knock-in.

Mediante questa genotipizzazione sono stati selezionati i topi positivi, ovvero quelli che esprimono il transgene PDGFR α umano poi utilizzati per lo studio.

3.2 Somministrazione sottocutanea continua di anticorpi anti-PDGFR α umano

L'esperimento è stato condotto su topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α eterozigoti di età compresa tra dodici e sedici settimane, maschi e femmine.

Anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano sono stati somministrati in tali topi transgenici usando minipompe osmotiche a rilascio continuo per 28 giorni (ALZET 2004D; DURECT Corporation, Cupertino, CA) [77] contenenti 200 μ l di PBS come controllo del veicolo o SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 (100 μ g) o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 (100 μ g) o la miscela di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 e VH_{PAM}-V λ 16F4 (50 μ g + 50 μ g) (Figura 10A).

I topi sono stati alloggiati in gabbie 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 standard ad libitum [79]. Tutte le procedure di cura e sperimentazione degli animali sono state approvate dal Ministero della Salute italiano (autorizzazione n. 634/2019-PR) ed eseguite secondo le convenzioni della Dichiarazione di Helsinki. Sono stati compiuti tutti gli sforzi possibili per ridurre al minimo la sofferenza degli animali [80].

Il giorno 0 le minipompe osmotiche sono state impiantate sotto la cute del dorso dei topi in un'area leggermente posteriore alle scapole (Figura 10B). Per ridurre al minimo la sofferenza dell'animale, l'impianto delle minipompe è stato eseguito in anestesia generale tramite maschera facciale con

flusso continuo di isoflurano all'1,5%, posizionando i topi su tappetini riscaldati per mantenere stabile la temperatura rettale a 37 ° C durante l'esperimento [80]. Inoltre, dopo qualsiasi procedura, i topi sono stati osservati due volte al giorno per monitorare il loro stato di salute e rilevare precocemente eventuali segni di sofferenza o di patologia.

Il giorno 28 le pompe sono state rimosse e gli animali sono stati sacrificati. Sono stati prelevati polmone e cute per l'analisi istologica e dell'espressione genica e il dosaggio dell'idrossiprolina.

I campioni di cute sono stati prelevati dall'area dorsale, circa 2 cm posteriormente al sito di impianto della pompa, congelati immediatamente in azoto liquido e conservati a -80 ° C per successive analisi molecolari o fissate in soluzione di formalina neutra tamponata al 10% (Sigma-Aldrich) e incluse in paraffina. I polmoni sono stati lavati immediatamente in PBS freddo e trattati come precedentemente descritto [80].

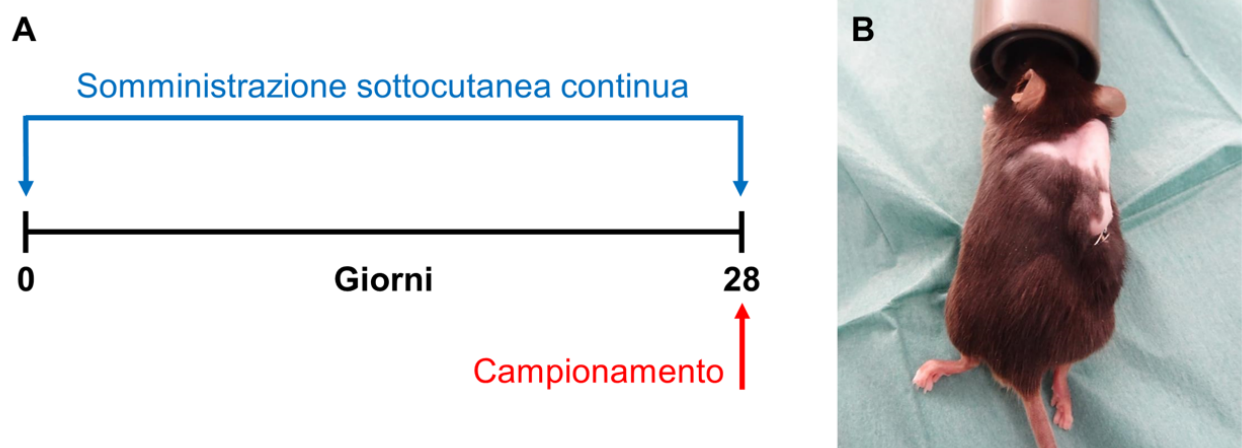


Figura 10. (A) Schema del modello sperimentale. Al fine di indurre la fibrosi sistemica, i topi sono stati sottoposti a somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano o PBS per 28 giorni e sono stati sacrificati il giorno 28. **(B)** La minipompa è stata impiantata per via sottocutanea nella zona del dorso, posteriormente alle scapole.

3.3 Istologia e immunoistochimica

I tessuti di cute e polmone inclusi in paraffina, sono stati tagliati in sezioni seriali di 5µm in spessore ciascuna. Le sezioni cutanee e polmonari sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E) (Bio-Optica, Milano, Italia) e con la colorazione Tricromica di Masson.

Per l'analisi immunoistochimica, lo smascheramento dell'antigene è stato eseguito con *una apposita pentola a pressione* a 90°C per 20 minuti, immergendo le sezioni in un *buffer* di citrato di sodio 0,01 M a pH 6,0. Dopo un lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate con H₂O₂ al 3% a temperatura ambiente per 10 minuti per bloccare l'attività della perossidasi endogena, lavate con PBS e incubate con il siero al 5% (Vector Laboratories) in una cameretta umidificata a temperatura ambiente per 25 minuti.

I macrofagi murini sono stati marcati con un anticorpo monoclonale Anti-Arginasi I diretto contro il topo (1: 200, sc-271430, Santa Cruz Biotechnology) incubando le sezioni in una camera umidificata a 4 °C per una notte.

Dopo opportuni lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario biotinilato di cavallo diretto contro le IgG murine (1:200; Vector Laboratories) in una camera umidificata a temperatura ambiente per 30 minuti. L'immunoreattività è stata sviluppata utilizzando il Kit VECTASTAIN ABC Peroxidase (Vector Laboratories) e SIGMA FAST 3,3'-Diaminobenzidine Tablets (Sigma-Aldrich). Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina, disidratate e montate con balsamo di montaggio a indurimento rapido Eukitt (Sigma-Aldrich).

Le sezioni di cute e polmone sono state osservate al microscopio ottico Nikon Eclipse E800 e le immagini digitali sono state acquisite con una fotocamera Nikon DXM 1220. Lo spessore cutaneo è stato calcolato con un ingrandimento microscopico di 10x misurando la distanza (µm) tra la giunzione epidermico-dermica e la giunzione di tessuto adiposo dermico-sottocutaneo in cinque campi per ciascuna sezione cutanea colorata con H&E [63].

Inoltre, la densità delle aree positive alla colorazione con Tricromica di Masson 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 PBS e i valori ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi statistica. Le misurazioni sono state eseguite da due osservatori indipendenti in cieco.

Le cellule immunoreattive sono state contate in cinque campi ad alto ingrandimento in ogni sezione con il software Nikon LUCIA IMAGE (versione 4.61; Laboratory Imaging, Praha,

Repubblica Ceca). Il conteggio delle cellule è stato eseguito da due osservatori indipendenti in cieco. Il numero medio di cellule positive per campione è stato utilizzato per analisi statistiche.

3.4 Determinazione dell'espressione del gene del collagene nei tessuti

I campioni di cute e polmone 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 [57]. I primers specifici utilizzati per valutare l'espressione genica del collagene murino sono i seguenti:

- Coll1A1 forward, 5'-ACATGTTACGTTTGTGGACC-3'; Coll1A1 reverse: 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3';
- Ciclofilina forward, 5'-GTGTTCTTCGACATCACGGC-3'; Ciclofilina reverse, 5'-GTGTTCTTCGACATCACGGC-3';
- 18S rRNA forward, 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3'; 18S rRNA reverse, 5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3';
- Human/Mouse GAPDH forward, 5'-CAGCGACACCCACTCCTCCAC CTT-3'; Human/Mouse GAPDH reverse, 5'-CATGAGGTCCACCACCCTG TTGCT-3'.

Le reazioni sono state eseguite in triplicato per ciascun campione, in un volume di 25 µl contenente 50 nanogrammi di cDNA, 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e 400 nM di primer. Sono stati impostati i seguenti parametri ciclici: denaturazione a 95 ° C per 15 secondi e riscaldamento a 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 di controllo trattati con PBS è stata calcolata con il metodo $\Delta\Delta C_t$.

3.5 Dosaggio dell'idrossiprolina

Per quantificare la quantità di collagene nel polmone, il contenuto di idrossiprolina è stato misurato mediante il kit di analisi dell'idrossiprolina (Sigma-Aldrich, #MAK008), secondo le istruzioni del produttore. L'assorbanza a 560 nm è stata determinata con un lettore di micropiastre (Elisa Plate Reader, Tecan) e i valori sono stati convertiti in contenuto di idrossiprolina usando una curva standard. La quantità di collagene (µg) è stata espressa rispetto ai topi di controllo trattati con PBS.

3.6 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 non accoppiato e 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 $P < 0,05$ sono stati considerati significativi.

4. RISULTATI

4.1 Induzione di fibrosi cutanea mediante somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano

La somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano stimolatori SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 o la miscela di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 e VH_{PAM}-V λ 16F4 , utilizzando una pompa osmotica impiantata sottocute a livello del dorso di topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α (n= 8/gruppo) dal giorno 0 al giorno 28 ha provocato una fibrosi cutanea rilevante.

L'analisi istologica della cute prelevata al giorno 28 ha documentato, infatti, nei topi trattati con anticorpi stimolatori rispetto al PBS, un ispessimento cutaneo con una maggiore deposizione di fasci di collagene densamente impaccati e disposti in modo irregolare (Figura 11, 12). Inoltre, gli strati di tessuto adiposo ghiandolare e sottocutaneo sono risultati ridotti e parzialmente sostituiti dall'infiltrazione delle fibre collagene [77, 78]. Al contrario, la somministrazione sottocutanea continua di PBS non ha causato alcun cambiamento della cute.

Per determinare se la aumentata deposizione di tessuto connettivo fosse dovuta ad un'aumentata sintesi di collagene, è stata analizzata l'espressione del gene Col1A1 mediante real-time PCR dell'mRNA estratto dalla cute. Si è osservato un aumento dell'espressione del gene Col1A1 a seguito di somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 + VH_{PAM}-V λ 16F4 nei topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α rispetto al controllo (PBS). Dati statisticamente non significativi nei topi trattati con VH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 dipendono dalla variabilità nella risposta dei diversi animali (Figura 13).

C57BL/6-hPDGFR α

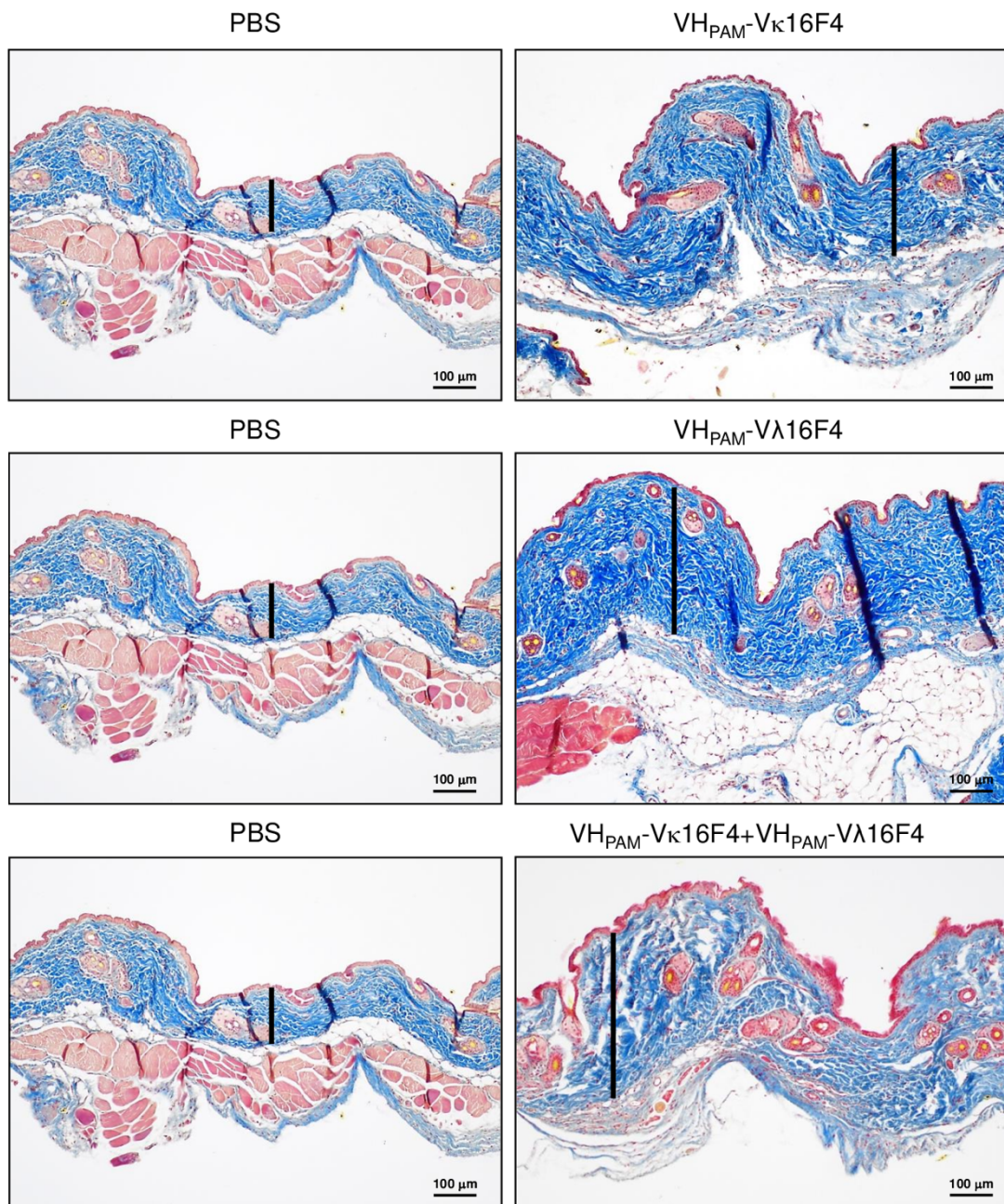


Figura 11. Le sezioni di cute biopsiata al giorno 28 da topi transgenici C57BL/6- hPDGFR α (n = 8 per gruppo) sono state colorate con la colorazione Tricromica di Masson. La somministrazione sottocutanea continua di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 + VH_{PAM}-V λ 16F4 ha provocato un ispessimento cutaneo e un aumento della deposizione di collagene rispetto al PBS. Sono mostrate immagini microscopiche (ingrandimento 10 $\times$) rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

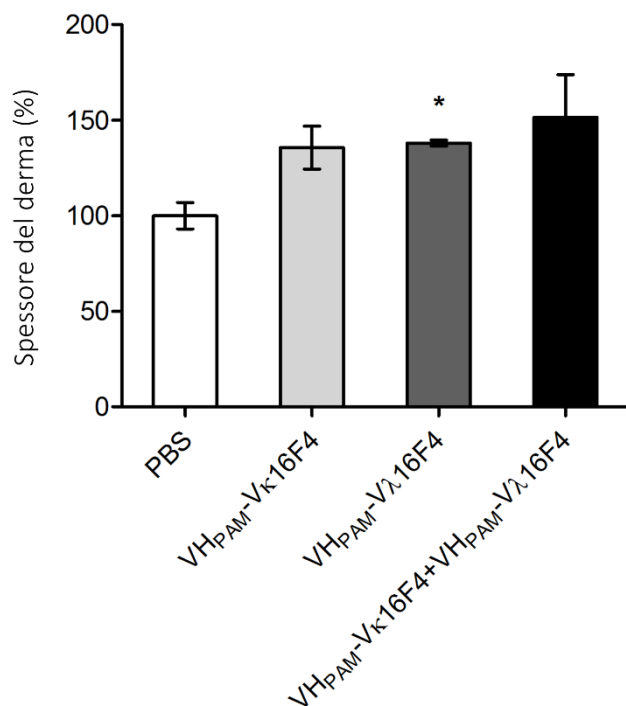


Figura 12. Spessore del derma delle sezioni cutanee ottenuto al giorno 28 da topi C57BL/6-hPDGFRα transgenici (n=8 per gruppo) che hanno ricevuto i trattamenti di cui sopra. Lo spessore cutaneo è stato misurato in cinque campi ad ingrandimento microscopico 10x per ciascuna delle sezioni di cute colorata con Tricromica di Masson. Lo spessore medio per ciascuna coorte di topi è stato espresso in percentuale rispetto a quello di topi trattati con PBS. * = P <0,05.

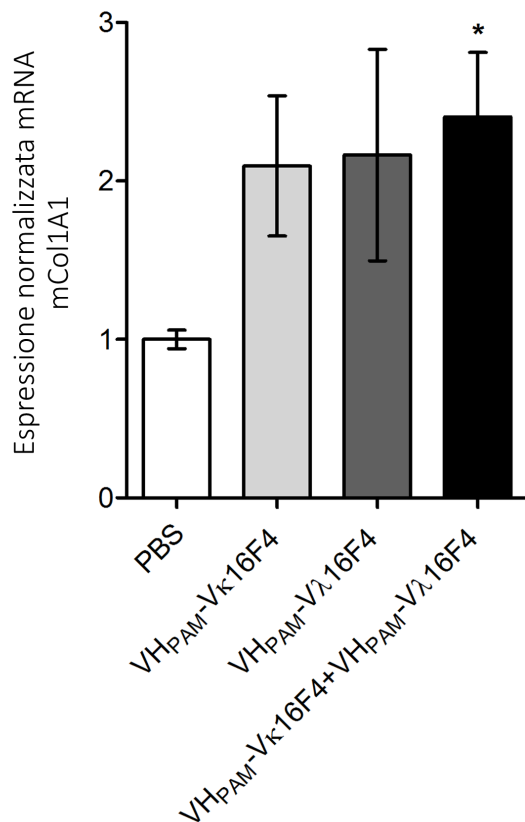


Figura 13. Analisi dell'espressione genica di Col1A1 nell'mRNA della cute campionata al giorno 28 da topi transgenici C57BL/6-hPDGFRα che hanno ricevuto i trattamenti sopra elencati. I risultati sono rappresentati come media ± DS (n=8 per gruppo) espressa in percentuale rispetto al valore ottenuto da topi trattati con PBS e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. * = P <0,05

4.2 Induzione di un iniziale danno polmonare mediante somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano

La somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano stimolatori SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 o la miscela di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 e VH_{PAM}-V λ 16F4 , utilizzando una pompa osmotica impiantata sottocute a livello del dorso di topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α (n= 8/gruppo) dal giorno 0 al giorno 28 ha provocato un iniziale danno polmonare.

L'analisi istologica del tessuto polmonare prelevato al giorno 28 ha documentato, infatti, un danno iniziale con aumento della deposizione di collagene a livello perivascolare e peribronchiolare nei topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α trattati con SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 rispetto al PBS (Figura 14). Inoltre, la somministrazione sottocutanea continua di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 + VH_{PAM}-V λ 16F4 ha indotto un'inflammatione polmonare prominente, con una diffusa infiltrazione di cellule infiammatorie alveolari e interstiziali, accompagnata da iperplasia broncoalveolare e distorsione della normale architettura degli alveoli. Topi controllo trattati con PBS (n=8) hanno dimostrato un'istologia polmonare normale.

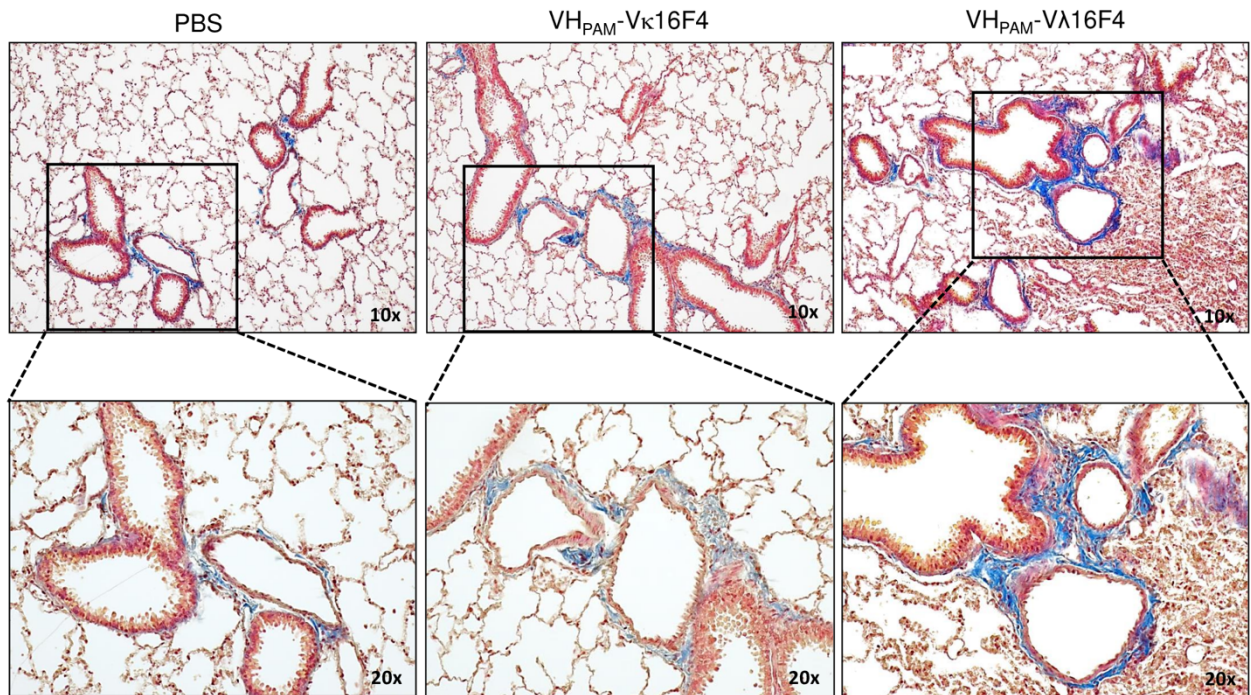


Figura 14. Le sezioni di polmone campionato al giorno 28 da topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α (n=8 per gruppo) sono state colorate con la colorazione tricromica di Masson. La somministrazione sottocutanea continua di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-V λ 16F4 ha comportato un aumento della deposizione di collagene perivascolare e peribronchiolare rispetto alla normale architettura polmonare dei topi controllo. Sono mostrate immagini microscopiche (ingrandimento 10x e 20x) rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

L'infiltrazione di cellule infiammatorie è stata evidenziata mediante colorazione con H&E e caratterizzata con la colorazione immunohistochimica per Arginasi-1, un marcatore specifico dei macrofagi M2 (Figura 15). Si è potuto osservare un aumento significativo di cellule positive alla colorazione con Arginasi-1 negli alveoli e negli spazi interstiziali rispetto al controllo trattato con PBS (Figura 16).

C57BL/6-hPDGFR α

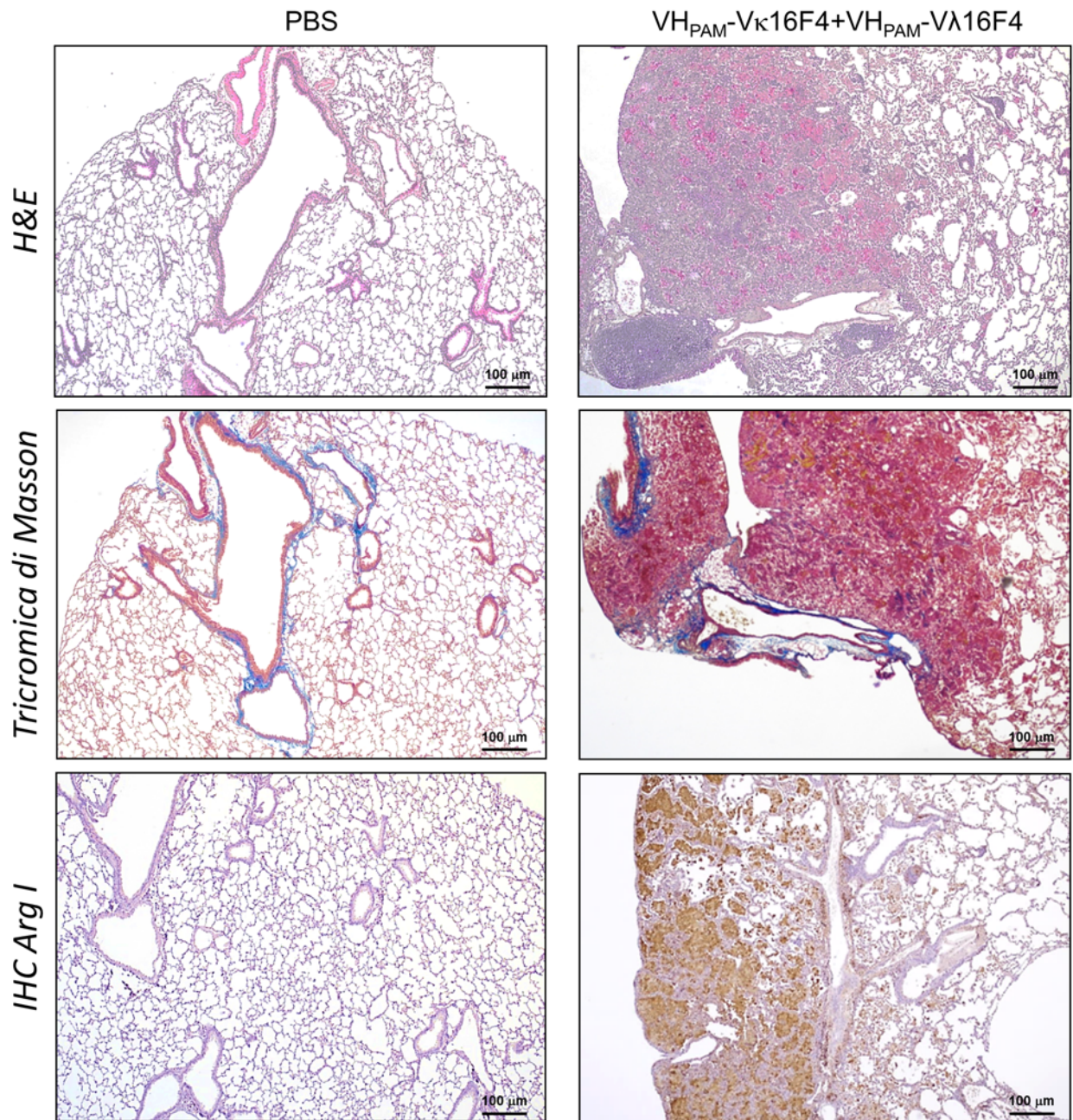


Figura 15. Massiccio infiltrato infiammatorio rivelato mediante colorazione con H&E nelle sezioni di tessuto polmonare prelevato al giorno 28 da topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α trattati con somministrazione sottocutanea continua di SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 + VH_{PAM}-V λ 16F4 rispetto al controllo (PBS). La colorazione tricromica di Masson ha dimostrato un aumento della deposizione perivascolare e peribronchiolare del contenuto di collagene. L'infiltrazione di cellule infiammatorie è stata caratterizzata da immunoistochimica per arginasi I. È stato osservato un aumento di macrofagi M2 positivi nei topi trattati con SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 + VH_{PAM}-V λ 16F4. Sono mostrate immagini microscopiche (ingrandimento 4 $\times$) rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

C57BL/6-hPDGFR α

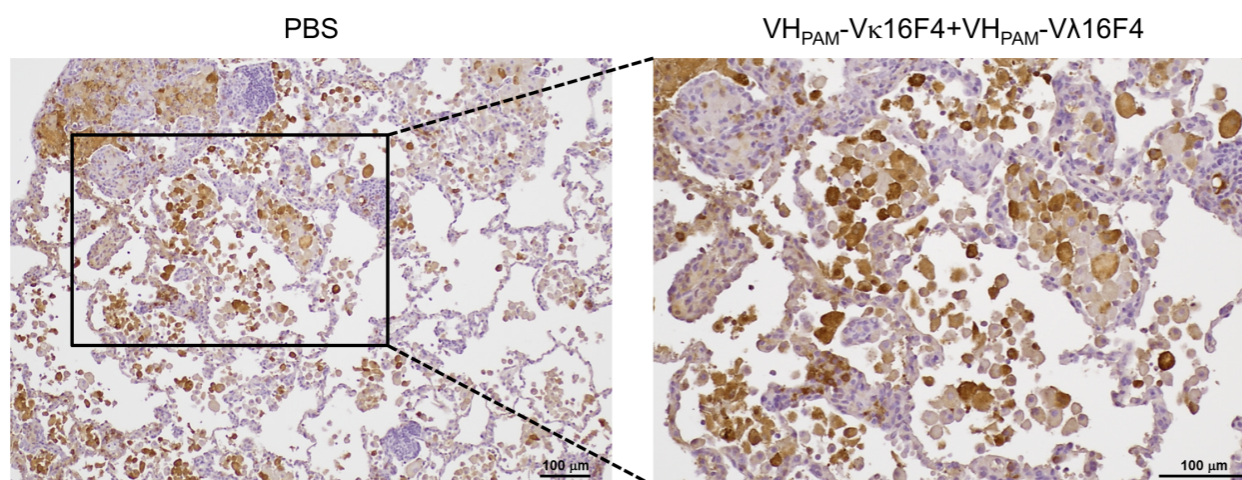


Figura 16. Cellule positive alla colorazione con anticorpo anti-Arginasi I nelle sezioni di polmone campionato al giorno 28 da topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α (n=8 per gruppo) dopo somministrazione sottocutanea continua di SSc-MabVH_{PAM}-Vκ16F4 + VH_{PAM}-Vλ16F4 che presentano, a ingrandimento più elevato, una distribuzione alveolare. Vengono mostrate immagini microscopiche (ingrandimento 10x e 20x) rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

L'espressione del gene Col1A1, analizzata mediante real-time PCR dell'mRNA estratto dal tessuto polmonare, ha rivelato un aumento dell'espressione del gene Col1A1 dopo somministrazione sottocutanea continua di anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano SSc-MabVH_{PAM}-Vκ16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-Vλ16F4 o la miscela di SSc-MabVH_{PAM}-Vκ16F4 e VH_{PAM}-Vλ16F4 in topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α rispetto al controllo (PBS). Dati statisticamente non significativi nei topi trattati con SSc-MabVH_{PAM}-Vκ16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-Vκ16F4 + VH_{PAM}-Vλ16F4 dipendono dalla variabilità nella risposta dei diversi animali (Figura 17).

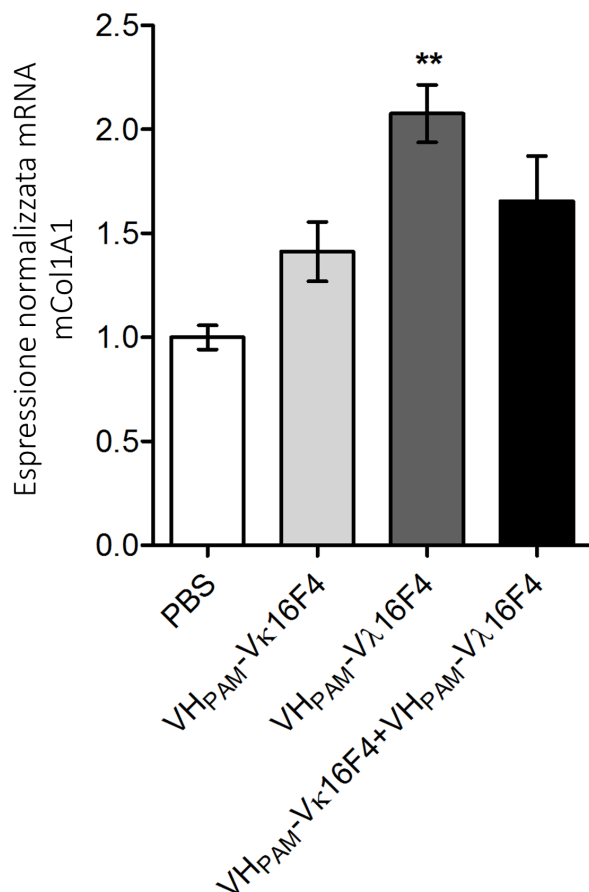


Figura 17. Analisi dell'espressione genica di Col1A1 nell' mRNA estratto da tessuto polmonare campionato al giorno 28 da topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α che hanno ricevuto i trattamenti sopra elencati. I risultati sono rappresentati come media $\pm$ SD (n=8 per gruppo) espressa in percentuale del valore ottenuto da topi trattati con anticorpi anti-PDGFR α umani rispetto al valore ottenuto dai topi trattati con PBS e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. * = P <0,05, ** = P <0,01

Per valutare meglio la fibrosi nei topi C57BL/6-hPDGFR α trattati con gli anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano, è stata eseguita la quantificazione del contenuto totale di collagene polmonare solubile e insolubile utilizzando il dosaggio dell'idrossiprolina [81], che ha confermato un aumento significativo del contenuto di collagene nei polmoni di topi trattati con anticorpi stimolatori, rispetto ai topi che hanno ricevuto PBS. Dati statisticamente non significativi nei topi trattati con SSc-MabVHPAM-Vκ16F4 dipendono dalla variabilità nella risposta dei diversi animali (Figura 18).

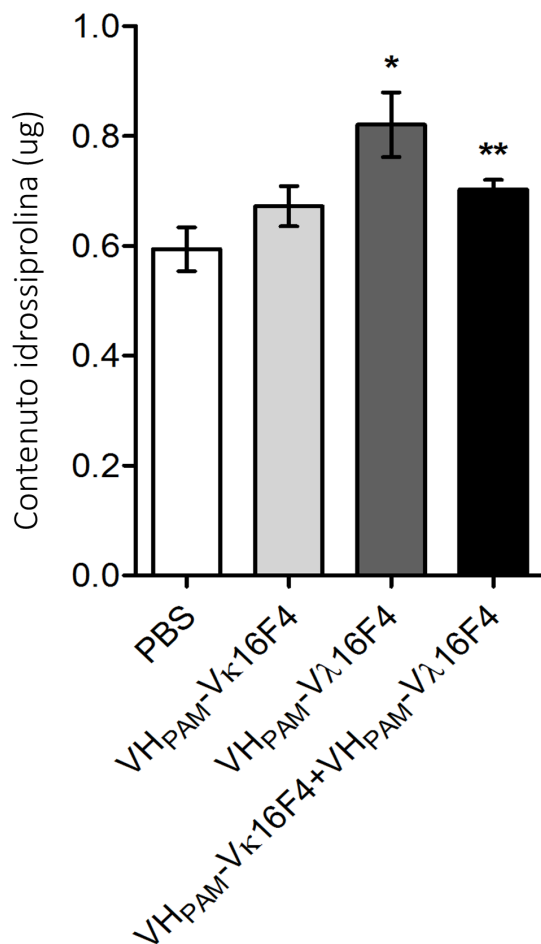


Figura 18. Contenuto di idrossiprolina nel tessuto polmonare di topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α che hanno ricevuto i trattamenti sopra elencati.

I risultati sono rappresentati come media $\pm$ SD (n=8 per gruppo) espressa in percentuale del valore ottenuto da topi umani trattati con anticorpi anti-PDGFR α rispetto ai valori ottenuti dai topi trattati con PBS e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. * = P <0,05, ** = P <0,01

L'aumentata deposizione di collagene perivascolare nei topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α trattati con anticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano è stata accompagnata da una maggiore espressione di α -SMA, un marker dei fibroblasti con fenotipo secernente il collagene. L'aumentata espressione di α -SMA da parte delle cellule muscolari lisce vascolari che circondano lo strato endoteliale è maggiormente evidenziabile nei piccoli vasi (Figura 19).

C57BL/6-hPDGFR α

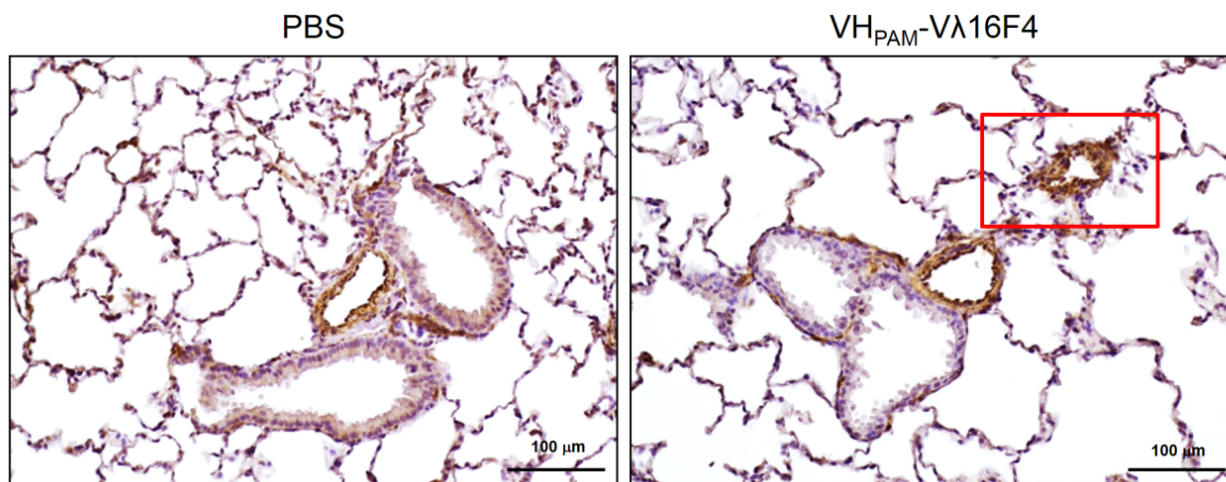


Figura 19. Determinazione immunoistochimica dell' α -SMA nel tessuto polmonare. Aumento della deposizione perivascolare dell' α -SMA nelle sezioni di tessuto polmonare campionato al giorno 28 da topi transgenici C57BL/6-hPDGFR α (n=8 per gruppo) dopo somministrazione sottocutanea continua di SSc-MabVH_{PAM}-Vλ16F4 (immagine rappresentativa, risultati simili sono stati ottenuti usando SSc-MabVH_{PAM}-Vκ16F4 o SSc-MabVH_{PAM}-Vκ16F4 + VH_{PAM}-Vλ16F4) rispetto ai topi controllo inoculati con PBS. Le sezioni polmonari sono state immunocolorate con anticorpo anti α -SMA. Sono mostrate immagini microscopiche (ingrandimento 20x).

5. DISCUSSIONE

La sclerosi sistemica è una malattia devastante dal punto di vista clinico e psicologico, con un forte impatto sulla qualità e sulle prospettive di vita delle persone colpite.

Nonostante i numerosi modelli sperimentali di SSc già descritti in letteratura [68] è ancora molto sentita l'esigenza di crearne di nuovi, al fine di definire i numerosi aspetti ancora ignoti della patogenesi di questa malattia e, conseguentemente, di identificare nuovi bersagli molecolari utilizzabili a scopo 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 (mAb) reattivi nei confronti del PDGFR α umano in grado di riprodurre *in vitro* la complessità delle immunoglobuline presenti nel siero *in toto* dei pazienti sclerodermici [57]. Tali autoanticorpi, a differenza di altri precedentemente descritti in letteratura, sono dotati di attività biologica, potendo quindi contribuire alla patogenesi della malattia. In particolare, come precedentemente detto, legando il PDGFR α presente sulla superficie cellulare dei fibroblasti, essi sono in grado di indurre uno stato profibrotico caratterizzato da una vivace attività proliferativa e da un'aumentata trascrizione dei geni del collagene.

Sulla base di queste evidenze, per dimostrare definitivamente che l'attivazione del PDGFR α è uno step rilevante nello sviluppo della fibrosi nella SSc, il gruppo di ricerca del laboratorio di Clinica Medica ha generato un nuovo modello murino umanizzato caratterizzato dall'espressione concomitante del PDGFR α umano e murino, denominato C57BL/6-hPDGFR α [69].

Il C57BL/6-hPDGFR α è il primo topo umanizzato PDGFR α mai generato; la caratterizzazione di questo modello ha mostrato un fenotipo robusto e non sofferente. Inoltre l'espressione del transgene hPDGFR α è stabile e ubiquitaria, sia a livello genico che proteico.

A differenza del modello di topo SCID con trapianto di cute umanizzata precedentemente utilizzato per testare l'attività biologica degli SSc-Mab, i topi C57BL/6-hPDGFR α sono immunocompetenti, ancora una volta uno scenario simile ai soggetti umani affetti da SSc [60].

Mediante iniezione intradermica di autoanticorpi monoclonali umani anti-PDGFR α in questo topo C57BL/6-hPDGFR α , è stato generato un nuovo modello sperimentale di sclerodermia.

L'inoculo di autoanticorpi stimolatori SSc-MabVH_{PAM}-V κ 16F4 o SSc-IgG nel topo transgenico ha indotto infatti un significativo ispessimento della cute e un'aumentata deposizione di collagene a livello del derma, con riduzione e parziale sostituzione del tessuto ghiandolare sottocutaneo. Al contrario la somministrazione di autoanticorpi non stimolatori SSc-Mab VH_{PAM}-V κ 13B8 o HD-IgG non ha indotto alterazioni significative [69].

Tuttavia, la cute non è l'unico organo bersaglio in corso di malattia e nessun modello sperimentale descritto in letteratura riproduce completamente lo spettro fisiopatologico della SSc [82].

È stato riportato che il rilascio sistemico di bleomicina attraverso diffusione continua con minipompe osmotiche impiantate a livello sottocutaneo può provocare fibrosi cutanea, polmonare e di altri organi interni [77]. Partendo da questa evidenza ci siamo proposti di esplorare questa via alternativa di somministrazione degli anticorpi, per riuscire ad indurre nel nostro modello murino la fibrosi anche di altri organi target, quali ad esempio i polmoni, e ottenere così un modello di sclerosi sistemica che possa riprodurre gli aspetti sistemici della malattia.

Le minipompe osmotiche sono state impiantate sotto la cute del dorso dei topi C57BL/6-hPDGFR α con rilascio continuo di autoanticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano per indurre la fibrosi sistemica. La quantità di collagene nella cute e nei polmoni è stata valutata con metodi istologici e quantificata usando saggi molecolari ed enzimatici.

A 28 giorni dall'impianto, abbiamo osservato un aumento della deposizione di collagene nella cute e della quantità di collagene perivascolare e peribronchiolare nei tessuti polmonari. In particolare, i topi trattati con una combinazione di SSc-Mab VH_{PAM}-V κ 16F4 e VH_{PAM}-V λ 16F4 hanno mostrato massicci infiltrati infiammatori con distorsione della normale architettura polmonare. In questo esperimento si è visto che la maggior parte delle cellule infiammatorie negli alveoli e negli spazi interstiziali sono macrofagi a fenotipo M2, gli stessi implicati nell'eccessiva riparazione dei tessuti e nella conseguente fibrosi degli organi.

Considerando che la SSc è caratterizzata da un diffuso danno microvascolare periferico, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle cellule muscolari lisce vascolari che circondano lo strato endoteliale della microvascolarizzazione polmonare: l'immunoistochimica ha dimostrato un aumento della deposizione di α -SMA, un marker dei fibroblasti con fenotipo secernente il collagene, soprattutto a livello dei piccoli vasi.

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono che il rilascio sistemico di autoanticorpi monoclonali anti-PDGFR α umano attraverso la somministrazione continua da minipompe osmotiche impiantate per via sottocutanea sia in grado di riprodurre una significativa fibrosi cutanea e una iniziale alveolite fibrosante. Di particolare interesse è il dato ottenuto dalla miscela dei due

anticorpi monoclonali agonisti ottenuti dallo stesso paziente ma diretti contro epitopi distinti del PDGFR α . La loro azione sinergica, risultante in un danno tissutale maggiore rispetto all'infusione dei singoli monoclonali, può riprodurre più fedelmente quanto avviene nel corso della malattia e suggerisce la presenza di almeno due distinti epitopi funzionali nella porzione extracellulare del PDGFR α umano.

Il modello murino C57BL/6-hPDGFR α delle minipompe presenta numerosi vantaggi: i) la fibrosi cutanea può essere raggiunta senza iniezioni ripetute e laboriose di autoanticorpi; ii) può offrire l'opportunità di esaminare contemporaneamente gli effetti di potenziali terapie sulla fibrosi polmonare e cutanea.

In prospettiva, il modello delle minipompe da noi generato risulta interessante per analizzare i meccanismi sottostanti alla fibrosi, identificare nuove strategie terapeutiche per la SSc e per la loro validazione preclinica. In particolare, il blocco *in vivo* degli epitopi funzionali riconosciuti dagli autoanticorpi anti-PDGFR α potrebbe essere una valida strategia terapeutica per inibire la via di segnalazione coinvolta nello sviluppo della SSc.

In alternativa, un recettore “esca” che catturi autoanticorpi anti-PDGFR α stimolatori potrebbe rivelarsi una strategia considerevole, come già sperimentato con successo in altre patologie immuno-mediate come l'artrite reumatoide utilizzando la molecola Etanercept.

6. BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. R.K. Arora-Singh, S. Assassi, D.J. del Junco, F.C. Arnett, M. Perry, U. Irfan, et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. *J Autoimmun*. 2010; 35 (1): 52-57.
6. 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.
7. M. Matucci-Cerinic, T. Krieg, L. Guillevin, 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.
8. 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.
9. 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.
10. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009;360(19):1989-2003.
11. Harrison, *Principi di Medicina Interna*.
12. 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.
13. 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.
14. 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
 15. 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.
 16. F.C. Arnett, P. Gourh, S. Shete, C.W. Ahn, R.E. Honey, S.K. Agarwal, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 822-827.
 17. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009; 33:3–11.
 18. 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.
 19. Gabrielli A, Montroni M, Rupoli S, Caniglia ML, DeLustro F, Danieli G. A retrospective study of antibodies against basement membrane antigens (type IV collagen and laminin) in patients with primary and secondary Raynaud’ s phenomenon. *Arthritis Rheum* 1988; 31:1432–1436.
 20. Heimark RL, Twardzik DR, Schwartz SM. Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* 1986; 233:1078–1080.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Svegliati S, Cancelli 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.

25. Xie Y, Zhang X, Wakasugi S, Makino T, Inoue Y, Ihn H. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in localized scleroderma. *Int J Dermatol* 2008; 47:438–442.
26. 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.
27. Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, et al. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993; 52:272–277.
28. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA Jr, Carreira PE, Riemekasten G, Clements PJ, Denton CP, Distler O, Allanore Y, Furst DE, Gabrielli A, Mayes MD, van Laar JM, Seibold JR, Czirjak L, Steen VD, Inanc M, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Valentini G, Veale DJ, Vonk MC, Walker UA, Chung L, Collier DH, Csuka ME, Fessler BJ, Guiducci S, Herrick A, Hsu VM, Jimenez S, Kahaleh B, Merkel PA, Sierakowski S, Silver RM, Simms RW, Varga J, Pope JE. Classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(11):2737-47.
29. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):80-93.
30. 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.
31. 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.
32. Moroncini G, Svegliati Baroni S, Gabrielli A. Agonistic antibodies in systemic sclerosis. *Immunol Lett.* 2018; 195:83-87.
33. 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.
34. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, Distler O, Clements P, Cutolo M, Czirjak L, Damjanov N, Del Galdo F, Denton CP, Distler JHW,

- Foeldvari I, Figelstone K, Frerix M, Furst DE, Guiducci S, Hunzelmann N, Khanna D, Matucci-Cerinic M, Herrick AL, van den Hoogen F, van Laar JM, Riemekasten G, Silver R, Smith V, Sulli A, Tarner I, Tyndall A, Welling J, Wigley F, Valentini G, Walker UA, Zulian F, Müller-Ladner U; EUSTAR Coauthors. Collaborators (98). Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(8):1327-1339.
35. Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L, Clements P, Denton C, Farge D, Figelstone K, Földvari I, Furst DE, Müller-Ladner U, Seibold J, Silver RM, Takehara K, Toth BG, Tyndall A, Valentini G, van den Hoogen F, Wigley F, Zulian F, Matucci-Cerinic M; EUSTAR Co-Authors. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). 2009;68(5):620-8.
 36. 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.
 37. Ramos-Casals, M. et al. Targeted therapy for systemic sclerosis: how close are we?. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2010; 6:269–278.
 38. 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.
 39. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47 Suppl 5:v2-4.
 40. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento EV. Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:640–645.
 41. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008; 22:1276–312.
 42. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med*. 2018 Aug; 62:44-62.
 43. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47 Suppl 5:v2-4.
 44. 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.
 45. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene*. 2017; 614:1-7.

46. 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.
47. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79:1283–316.
48. 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.
49. John S. Cho, Terry C. Fang, Taylor L. Reynolds, Daniel J. Sofia, Stefan Hamann, and Linda C. Burkly¹. PDGF-BB Promotes Type I IFN-Dependent Vascular Alterations and Monocyte Recruitment in a Model of Dermal Fibrosis *PLoS One.* 2016; 11(9): e0162758.
50. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:255–73.
51. 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.
52. Iwayama T, Olson LE. Involvement of PDGF in fibrosis and scleroderma: recent insights from animal models and potential therapeutic opportunities. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15(2):304.
53. Liu, T., Zhang, J., Mu, X., Su, H., Hu, X., Liu, W., Zhao, E., Li, W.,. RNA interference against platelet-derived growth factor receptor alpha mRNA inhibits fibroblast transdifferentiation in skin lesions of patients with systemic sclerosis. *PLoS One.* 2013; (4), e60414.
54. Glim, J.E., Niessen, F.B., Everts, V., van Egmond, M., Beelen, R.H. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha-smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts. *Immunobiology* 2013; 218 (6), 924- 929.
55. 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.
56. Moroncini G et al, *World Biomedical Frontiers, Arthritis* 2015.
57. 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.
58. 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.
 59. 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.
 60. Luchetti MM, Moroncini G, Jose Escamez M, Svegliati Baroni S, Spadoni T, Grieco A, et al. Induction of Scleroderma Fibrosis in Skin-Humanized Mice by Administration of Anti-Platelet- Derived Growth Factor Receptor Agonistic Autoantibodies. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(9):2263-73.
 61. 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.
 62. Yue X, Yu X, Petersen F, Riemekasten G. Recent advances in mouse models for systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2018;17(12):1225-34.
 63. Manetti M, Rosa I, Milia AF, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1700-9.
 64. Asano Y, Sato S. Animal models of scleroderma: current state and recent development. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15(12):382.
 65. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):2831-44.
 66. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum.* 2011;63(6):1707-17.
 67. 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.

68. Asano Y, Sato S. Animal models of scleroderma: current state and recent development. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15:382.
69. Moroncini G, Paolini C, Orlando F, Grieco A, Agarbati S, Tonnini C, Svegliati S, Spadoni T, Funaro A, Avvedimento E, Provinciali M, Gabrielli A. Generation of human PDGFR α -transgenic mouse: a novel experimental model of skin fibrosis. 16th international workshop on scleroderma research.
70. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFR α activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* 2009;16(2):303-13.
71. Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Giacconi R, Costarelli L, Pierpaoli S, et al. Survival study of metallothionein-1 transgenic mice and respective controls (C57BL/6J): influence of a zinc-enriched environment. *Rejuvenation Res.* 2012;15(2):140-3
72. Flurkey K, M. Curren J, Harrison DE, Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, et al. Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research. *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)*. Burlington: Academic Press; 2007. p. 637-72.
73. Abzazou T, Salvado H, Cardenas-Youngs Y, Becerril-Rodriguez A, Cebiran EMC, Huguet A, et al. Characterization of nutrient-removing microbial communities in two full-scale WWTP systems using a new qPCR approach. *Sci Total Environ.* 2018;618:858-65.
74. 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.
75. Wermuth PJ, Mendoza FA, Jimenez SA. Abrogation of transforming growth factor-beta-induced tissue fibrosis in mice with a global genetic deletion of Nox4. *Lab Invest.* 2018;99(4):470-82.
76. Moroncini G, Paolini C, Orlando F, Capelli C, Grieco A, Tonnini C, et al. Mesenchymal stromal cells from human umbilical cord prevent the development of lung fibrosis in immunocompetent mice. *PLoS One.* 2018;13(6):e0196048.
77. 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.
78. Liang M, Lv J, Zou L, Yang W, Xiong Y, Chen X, et al. 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.
79. Orlando F, Paolini C, Agarbati S, Tonnini C, Grieco A, Capelli C, et al. Induction of Mouse Lung Injury by Endotracheal Injection of Bleomycin. *J Vis Exp.* 2019;(146).

- 80.** Moroncini G, Paolini C, Orlando F, Capelli C, Grieco A, Tonnini C, et al. Mesenchymal stromal cells from human umbilical cord prevent the development of lung fibrosis in immunocompetent mice. *PLoS One*. 2018;13(6):e0196048.
- 81.** Kliment CR, Englert JM, Crum LP, Oury TD. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(4):349-55.
- 82.** Marangoni RG, Varga J, Tourtellotte WG. Animal models of scleroderma: recent progress. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(6):561-70.