

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Corso di Dottorato in Biotecnologie Applicate alle Scienze Mediche

XXV ciclo

Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità



LOCALIZZAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE ISOFORME
DELL'INTERLEUCHINA 17 NEL DERMA DI PAZIENTI AFFETTI DA
PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Settore disciplinare MED/16 - Reumatologia

Lonati Paola Adele

Tutor: Chiariss.mo Prof. Pierluigi Meroni

Coordinatore: Prof. Alessandro Gianni

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

INDICE.....	3
INTRODUZIONE	7
1. PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE	8
1.1. Sclerosi Sistemica (SSc).....	8
1.1.1 Epidemiologia.....	8
1.1.2 Eziologia	8
1.1.3 Classificazione	9
1.1.4. Patogenesi.....	9
1.1.5. Trattamento	12
1.2. Sclerodermia localizzata (LS o Morphea)	13
1.1.1. Epidemiologia.....	13
1.1.2. Patogenesi.....	13
1.1.3. Caratteristiche Istologiche	14
1.1.4. Caratteristiche Sierologiche	14
1.1.5. Trattamento	14
1.3. Acrodermatite Cronica Atrofizzante (ACA)	15
1.4. Fascite Eosinofila (EF) o di Shulman	16
1.1.1 Manifestazioni cutanee di EF	16
1.1.2 Caratteristiche biologiche di EF.....	17
1.5. Malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD).....	17
2. LA FAMIGLIA DELLE CITOCHINE IL-17.....	18
2.1. IL-17A e IL-17F.....	19
2.2. IL-17B, C e D	20
2.3. IL-17E/IL-25	21
3. LA FAMIGLIA DEI RECETTORI DELLE CITOCHINE IL-17.....	22
3.1. IL-17RA	22
3.2. IL-17RC	23
3.3. IL-17RB	23
3.4. IL-17RD	23
3.5. IL-17RE.....	23
4. CITOCHINE CORRELATE A IL-17: IL-22, IL-4 E IFN- γ	24
4.1. IL-22.....	24
4.2. IL-4.....	25
4.3. INF- γ	25
5. CENNI DI MICROSCOPIA	27

5.1. Microscopio ottico e digitale.....	27
5.2. Microscopia virtuale.....	28
5.3. Microscopio a fluorescenza	29
5.4. Microscopio confocale	30
SCOPO DELLO STUDIO	32
MATERIALI E METODI.....	34
1. INDIVIDUI	35
2. ANTICORPI E REAGENTI.....	36
2.1. Anticorpi Primari	36
2.2. Anticorpi Secondari.....	36
2.3. Sistemi di rivelazione.....	36
3. IMMUNOISTOCHEMICA (IHC)	37
3.1. Preparazione delle sezioni istologiche	37
3.2. Tecnica e strumenti.....	37
4. IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IIF)	39
4.1. Tecnica e strumenti.....	39
5. MICROSCOPIA.....	40
6. Metamorh/MetaXpress Software (Molecular Device).....	40
6.1. Journal IHC	40
6.2. Journal IIF	41
7. Analisi statistica.....	42
RISULTATI	43
1. MESSA A PUNTO DELLE COLORAZIONI DI IMMUNISTOCHEMICA PER LE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17, DEI RISPETTIVI RECETTORI E DELLE CITOCHINE CORRELATE.....	44
2. LOCALIZZAZIONE DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE	45
3. QUANTIFICA DELLA PRESENZA DELLE DIVERSE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE	46
4. RICERCA DELLE CELLULE RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE	47
5. RUOLO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ILOPROST NELL'ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI SCLERODERMICI.....	48
FIGURE.....	50
DISCUSSIONE	96
1. TECNICHE DI SMASCHERAMENTO O RECUPERO DEGLI ANTIGENI	97

2. LOCALIZZAZIONE E QUANTIFICA DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE	98
3. IDENTIFICAZIONE DELLE CELLULE RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLE DIVERSE PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE	100
4. RUOLO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ILOPROST NELL'ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI SCLERODERMICI.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	103

INTRODUZIONE

1. PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

La fibrosi è una complessa risposta tissutale a diversi eventi patologici ed è caratterizzata principalmente da un'eccessiva produzione matrice extracellulare (ECM), e in particolare da collagene. Nella maggior parte dei casi la fibrosi può essere vista come un processo volto alla riparazione del danno tissutale, che per varie e poco chiare ragioni non viene controllato né portato a termine nel modo corretto. È altamente probabile che l'infiammazione giochi un ruolo nell'avvio o nel mantenimento dei processi che portano alla fibrosi. Infatti le fasi iniziali della fibrosi sono caratterizzate dalla presenza di infiltrato infiammatorio, e le cellule infiammatorie possono modificare in modo evidente la produzione di ECM rilasciando prodotti solubili o mediante interazione diretta cellula-cellula con lo scopo di modificare il metabolismo dei fibroblasti (Chizzolini C et al., 2011).

Di seguito verranno discusse alcune patologie che presentano tra i loro sintomi principali la fibrosi, e che sono state prese in esame in questo studio.

1.1. Sclerosi Sistemica (SSc).

La Sclerosi Sistemica, detta anche Sclerodermia o SSc, è una patologia del tessuto connettivo di eziologia sconosciuta caratterizzata da fibrosi progressiva della cute e degli organi interni.

1.1.1 Epidemiologia

La prevalenza di questa patologia è stimata intorno a 276/milione negli USA con un'incidenza di circa 19 nuovi casi per milione di adulti per anno. La diagnosi avviene normalmente durante la quinta decade. La patologia viene sviluppata negli individui in modo significativamente differente a seconda di sesso, età, razza e fattori geografici. Infatti la Sclerodermia è più frequente nella popolazione afro-americane che in quella caucasica e le donne manifestano più frequentemente la patologia rispetto agli uomini con un rapporto di incidenza da 3 a 14:1 (Brembilla NC et al., accepted).

1.1.2 Eziologia

L'eziologia della Sclerodermia è ad oggi sconosciuta, anche se si pensa che fattori ambientali, agendo su un background genetico predisponente possano provocare una risposta immunitaria-infiammatoria anomala, e quindi giocare un ruolo nell'eziologia della SSc.

La Sclerodermia è più frequente nelle famiglie (1,6%) rispetto alla popolazione generale (0,026%), ma non viene ereditata secondo le regole Mendeliane, sottolineando il fatto che la genetica svolge un ruolo importante nella suscettibilità e progressione di questa patologia.

Numerosi altri fattori sono stati proposti come agenti causativi della SSc, quali l'esposizione a solventi organici e tossine, sia a casa che sul posto di lavoro. Inoltre la presenza di virus come il citomegalovirus umano (CMV) e lo stress ossidativo associato alla generazione di radicali liberi possono essere compresi tra gli agenti causativi della patologia e possono inoltre modificare la progressione della SSc (Abraham DJ et al., 2005; Brembilla NC et al., accepted).

1.1.3 Classificazione

I criteri classificativi per la Sclerodermia sono stati stilati nel 1980 dall'American College of Rheumatology, ACR (allora America Rheumatism Association).

La sclerodermia può essere classificata in due varianti principali, la forma cutanea limitata (lcSSc) e la forma cutanea diffusa (dcSSc) in base all'interessamento cutaneo e al profilo anticorpale.

La lcSSc è caratterizzata da manifestazioni vascolari e da interessamento cutaneo distale (gomiti e ginocchia) e del viso con lieve fibrosi sia della cute che degli organi interni rispetto alla forma diffusa e da un grado di progressione della patologia lento. La forma limitata è inoltre caratterizzata dalla positività per gli auto-anticorpi anti-centromero (ACA).

La forma diffusa, invece, è caratterizzata da fibrosi rapida e progressiva della cute (colpisce anche cosce, tronco e avambracci) e degli organi interni, portando ad un elevato rischio di morte (LeRoy EC et al., 1988).

1.1.4. Patogenesi

Danno Vascolare

Il danno vascolare è uno dei primi eventi nel corso di Sclerodermia, dovuto a un'anomala vaso-reattività accompagnata da angiopatia strutturale, che porta a ipossia tissutale. Questo provoca diminuzione del flusso sanguigno nei capillari, proliferazione a livello della tonaca intima e fibrosi dell'avventizia, caratteristiche delle manifestazioni cliniche quali il fenomeno di Raynaud, le ulcere digitali, l'ipertensione polmonare arteriosa e le crisi renali ipertensive.

Il rimodellamento vascolare è preceduto dall'attivazione delle cellule endoteliali (EC) che esprimono molecole di adesione e promuovono la formazione di un infiltrato infiammatorio perivascolare, provocando così danno e apoptosi alle cellule endoteliali. Le cellule endoteliali attivate rilasciano inoltre endotelina-1 (ET-1), un potente vasocostrittore che promuove l'adesione leucocitaria, la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari e l'attivazione dei fibroblasti. Dati di letteratura mostrano infatti che elevati livelli di ET-1 sono presenti nel sangue e nel fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL) di pazienti affetti da Sclerodermia. Nonostante gli elevati livelli di ipossia tissutale, l'angiogenesi in pazienti affetti da SSc è compromessa, mentre alti livelli di fattori angiogenetici come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) sono riscontrabili sia nel siero che nei tessuti dei pazienti. L'induzione di VEGF nei pazienti affetti da Sclerodermia sembra essere mediata dalle citochine presenti nel microambiente come l'Interleuchina (IL)-1, il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il fattore di crescita trasformante (TGF)- β più che dall'ipossia (Liakouli V et al., 2011).

Oltre al danno vascolare, la fibrosi tissutale è un'ulteriore importante caratteristica della sclerodermia. La fibrosi è il risultato di un'eccessiva produzione dei componenti della matrice extracellulare (ECM), in particolare di collagene, da parte di fibroblasti con regolazione alterata e da cellule mesenchimali attivate, accompagnata da una degradazione e da un "turnover" compromessi della ECM. L'ECM ha anche il ruolo di riserva di TGF- β , del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) e di altri fattori di crescita che partecipano al controllo del differenziamento, del funzionamento e della sopravvivenza delle cellule mesenchimali. La progressiva sostituzione dell'architettura del tessuto con ECM arricchita

di collagene, compromette la funzionalità degli organi interessati, e quindi la patologia. Mediatori solubili prodotti da piastrine, cellule endoteliali, cellule epiteliali e cellule infiammatorie nel microambiente controllano l'attivazione e il differenziamento dei fibroblasti. Nella Sclerodermia i fibroblasti mostrano un fenotipo attivato tipico dei miofibroblasti caratterizzato, tra le altre cose, da elevata produzione di collagene, TGF- β , CTGF, IL-6, ET-1, "monocyte chemotactic protein-1" (MCP-1), resistenza a IFN- γ e a segnali inibitori mediati dal contatto con cellule T, così come da aumentata proliferazione e diminuita apoptosi (Brembilla NC et al., accepted).

Infiltrato infiammatorio

Vi sono inoltre evidenze del coinvolgimento del sistema immune nella patogenesi della Sclerodermia. Dati di letteratura mostrano che lesioni precoci di SSc presentano infiltrato infiammatorio composto prevalentemente da monociti/macrofagi e da linfociti $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ attivati precedente rispetto allo sviluppo di vasculopatia e di fibrosi (Fleischmajer R et al., 1977; Giacomelli R et al., 1988; Prescott RJ et al., 1992; Roumm AD et al., 1984).

L'infiltrato cutaneo è presente soprattutto nelle fasi iniziali della fase infiammatoria edematosa della Sclerodermia, e diminuisce con il passaggio alla fase sclerodermica. Le cellule T CD4+ sono più numerose rispetto alle CD8+ sia negli infiltrati che nel sangue periferico dei pazienti, mentre il rapporto CD4:CD8 è diminuito del fluido BAL (Hussein MR et al., 2005).

Cellule T attivate possono a loro volta indurre l'attivazione di fibroblasti adiacenti sia per contatto diretto che per azione paracrina di citochine e chemochine secrete.

Autoanticorpi

Infine le cellule T autoreattive possono interagire con le cellule B e guidare così la produzione di autoanticorpi, la cui presenza nel siero dei pazienti è una caratteristica tipica della patologia.

Il 95% dei pazienti presentano positività per gli anticorpi anti-nucleo (ANA), mentre il 50% della specificità anticorpale dei pazienti sclerodermici è costituito da anticorpi anti-topoisomerasi-I (ATA), anti-centromero (ACA) e anti-RNA polimerasi I e III (ARA) (Kuwana M et al., 1995).

Il pattern specifico degli ANA è importante per la diagnosi e fornisce informazioni per il pattern clinico e per la prognosi della patologia, ma ciononostante non vi sono evidenze di un diretto coinvolgimento di questi anticorpi nella fibrosi tissutale.

Altri autoanticorpi non diretti contro auto-antigeni ubiquitari sono stati identificati nella sclerodermia e sembrano avere un ruolo diretto nel turnover della ECM. Un esempio possono essere anticorpi anti-MMP1 e MMP3, anticorpi in grado di inibire l'attività enzimatica di questi enzimi.

Dati di letteratura indicano che la somministrazione di alte dosi di agenti immunosoppressivi e il trapianto di cellule ematopoietiche autologhe (HSCT) in pazienti affetti da dcSSc determina un forte miglioramento della pelle e delle funzioni generali, sottolineando il ruolo importante del sistema immunitario nella patogenesi di Sclerodermia (Nash RA et al., 2007).

Coinvolgimento cutaneo

Nelle fasi precoci la cute appare edematosa, con tumefazioni soprattutto a livello delle dita delle mani. Successivamente la cute diventa ispessita e lucida con perdita degli annessi cutanei.

L'entità del coinvolgimento cutaneo è molto variabile, e passa da sclerodattilia nelle forme più lievi, fino a impedimento nel normale movimento degli arti nelle forme più severe. Il coinvolgimento cutaneo evolve in senso disto-proximale e nella forma diffusa l'evoluzione completa avviene nel corso di 1-3 anni.

Il viso è colpito in entrambe le forme di SSc; la rima buccale si riduce, le rughe del viso si appianano, compaiono solchi periorali a raggera, il naso si assottiglia e si perde la mimica facciale. Queste caratteristiche prendono il nome di "facies sclerodermica".

Nella forma limitata è frequente la comparsa di teleangectasie, dovute alla dilatazione dei capillari, a livello di viso, polpastrelli e mucose (Clements P et al., 1995).

Coinvolgimento d'organo

Numerosi sono gli altri organi, oltre la cute ad essere potenzialmente interessati nella SSc.

- Interessamento gastrointestinale. Inizia con danno da denervazione, con conseguente disfunzione, atrofia e quindi fibrosi da parete (Di Trapani G et al., 1982);
- Interessamento epatico e biliare. Il fegato è raramente coinvolto, ma esiste una forte associazione tra forma limitata e cirrosi biliare primitiva (CBP) (Bartholomew LG et al., 1964);
- Interessamento articolare. È più comune nei pazienti con dcSSc rispetto ai pazienti con lcSSc. L'ispessimento cutaneo e la fibrosi dei tendini possono causare contratture articolari (Steen VD et al., 1997);
- Interessamento muscolare. La debolezza muscolare è molto frequente. Tale miopatia è spesso associata a minima elevazione degli enzimi muscolari (Hietatharju A et al., 1993);
- Interessamento polmonare (ILD). Dopo quello esofageo è l'interessamento viscerale più frequente. È più frequente in pazienti affetti dalla forma diffusa rispetto a quelli con la forma limitata. È diventata la prima causa di morte nei pazienti con SSc, responsabile del 30% dei decessi (Steen VD et al., 1997);
- Interessamento renale. Forme lievi di interessamento renale sono frequenti nei pazienti affetti da SSc, come ipertensione arteriosa, proteinuria non significativa e modesto incremento della creatininemia. Sembra che l'interessamento renale sia presente nel 60-80% dei pazienti affetti da SSc (Martini G et al., 2006);
- Interessamento cardiaco. È una complicanza precoce che può essere presente dal 10 al 100% dei casi, a seconda dello strumento diagnostico utilizzato. Può interessare l'endocardio, il miocardio, il pericardio e anche il tessuto di conduzione. Una riduzione della contrattilità miocardica è secondaria alla fibrosi del tessuto miocardico (Perera A et al., 2007);
- Ipertensione arteriosa polmonare (PAH). È determinata da un incremento delle resistenze vascolari polmonari, secondario a un'eccessiva vasocostrizione dovuta a disfunzione endoteliale. La PAH è una complicanza tardiva di SSc, ed è più frequente nella forma limitata della patologia e in particolare tra i pazienti positivi per ACA e con manifestazioni vascolari importanti (Steen VD et al., 2003);

- Interessamento neurologico. È un interessamento estremamente variabile, e comprende neuropatie dei nervi cranici (soprattutto del trigemino) e la sindrome del tunnel carpale. Le polineuropatie periferiche sono più frequenti nella dcSSc (Tuffanelli D et al., 1961; Gordon RM et al., 1970);
- Interessamento genito-urinario. Nell'80% degli uomini affetti si riscontra disfunzione erettile (Walzer UA et al., 2009). Nelle donna è comune una diminuita lubrificazione vaginale e una riduzione dell'introito vaginale (Bhaduaria S et al., 1995).

1.1.5. Trattamento

Numerosi farmaci vasoattivi come i bloccanti dei canali del calcio, gli ACE inibitori, gli antagonisti del recettore dell'angiotensina II e il sildenafil sono in grado di ridurre il fenomeno di Raynaud. Inoltre è stato dimostrato che il bosentan è in grado di inibire la formazione di nuove ulcere della cute a livello delle estremità.

Iloprost

Un analogo sintetico stabile della Prostaglandina I₂ (PGI₂ o Prostaciclina) è ampiamente utilizzato per il trattamento delle complicazioni collegate alla vasculopatia della SSc. L'analogo della PGI₂ Iloprost funziona molto bene nel migliorare le ulcere digitali (DU). Questo farmaco, inoltre, mostra in vitro proprietà antifibrotiche e può avere effetti benefici in corso di SSc.

L'Iloprost media i suoi effetti legando con alta affinità il recettore della prostaciclina (IP), un recettore accoppiato a proteina G, inducendo l'attivazione della via di segnale dell'adenilato ciclasi. Questo analogo della prostaciclina può anche legare con affinità minore altri recettori della famiglia dei prostanoidi.

Gli analoghi della PGI₂ down-regolano l'adesione dei linfociti alle cellule endoteliali e inibiscono la produzione di TNF-α da parte di linfociti, monociti e cellule dendritiche (Stratton R et al., 2001; Truchetet ME et al., 2012; Bali G et al., 2011).

N-acetilcisteina (NAC)

L'N-acetilcisteina (NAC) è una sostanza sulfidrilica con un elevato potere antiossidante e con azione detossificante per le cellule, ed è un precursore dell'antiossidante glutatione. Questo farmaco è stato proposto circa 50 anni fa come mucolitico per le patologie polmonari croniche ed è attualmente usato per il trattamento delle patologie fibrotiche polmonari poiché è in grado di ripristinare i ridotti livelli di glutatione, aumentando la funzionalità polmonare. Questo farmaco è inoltre utilizzato nel trattamento di SSc per le sua capacità vasodilatative e di eliminare i radicali liberi dell'ossigeno (Rosato E et al., 2009).

1.2. Sclerodermia localizzata (LS o Morphea)

La sclerodermia localizzata (LS o Morphea) è una patologia ad eziologia sconosciuta che comprende un ampio spettro di patologie autoimmuni sclerotiche che colpiscono soprattutto la pelle. A seconda dei diversi sottotipi, può coinvolgere il tessuto adiposo, la fascia, i muscoli, e le ossa. Al contrario della Sclerodermia Sistemica, la LS non colpisce gli organi interni come cuore, polmoni, reni e tratto gastrointestinale.

Sebbene LS e SSc mostrino simili processi patogenetici, tra cui il rilascio di citochine proinfiammatorie e la disregolazione del metabolismo del tessuto connettivo, le due patologie raramente coesistono e altrettanto raramente avviene il passaggio dall'una all'altra.

1.1.1. Epidemiologia

LS è una patologia rara che sembra essere più frequente nei soggetti di razza bianca, ma può colpire tutte le razze, con una incidenza che va da 0,4 a 2,7 per 100.000 abitanti. È più frequente nelle donne con un rapporto 2.6-6:1. Può comparire a tutte le età, ma il picco di incidenza varia a seconda del sottotipo di LS, il più frequente dei quali è la Morphea (o Limitata). Essa compare generalmente negli adulti nella quarta decade. Le altre forme di Sclerodermia Localizzata sono chiamate Generalizzata, Lineare e Profonda.

1.1.2. Patogenesi

Le caratteristiche tipiche della LS sono l'iperproduzione di collagene e l'aumentata deposizione di ECM.

L'esatta causa scatenante ad oggi è sconosciuta. È stato ipotizzato che determinati stimoli, come le infezioni, i traumi, le radiazioni o i farmaci possano causare danni microvascolari che provocano il rilascio di molecole d'adesione. L'up-regolazione di alcune di queste molecole d'adesione come VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule-1) e ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) può indurre l'attivazione delle cellule T che a loro volta attivano il rilascio di citochine profibrotiche quali il TGF- β e le sue proteine di trasduzione del segnale dette SMAD, il PDGF, e le interleuchine 4, 6 e 8.

Questo processo profibrotico include anche un ampio spettro di chemochine in grado di contribuire alla sclerosi della pelle.

Infine, come nella SSc, l'attivazione di tutti questi segnali profibrotici e proinfiammatori portano ad un'eccessiva produzione di collagene e ad una diminuzione delle metalloproteinasi della matrice (MMP), responsabili della degradazione del collagene.

Sebbene molto sia noto riguardo alle fasi precoci di infiammazione, e riguardo i meccanismi molecolari coinvolti nelle reazioni dei fibroblasti della LS, poco è conosciuto riguardo la causa scatenante della patologia. Tra gli agenti infettivi molti studi sono stati fatti sulla *Borrelia*. Tra i farmaci in grado di indurre LS, le maggiori evidenze riguardano la bleomicina, la D-penicillamina, la vitamina K, e il L-5-idrossitriptofano in associazione alla carbidopa. Alcuni studi indicano l'esistenza di una forma di LS indotta dalle radiazioni in donne con carcinoma mammario. Clinicamente l'LS indotta dalle radiazioni potrebbe essere indistinguibile dalla radiodermatite cronica, ma solitamente le analisi istopatologiche distinguono tra le due patologie.

Infine, tra le cause scatenanti possono essere inseriti anche i danni meccanici e i traumi.

1.1.3. Caratteristiche Istologiche

Due fasi sono distinguibili nella Sclerodermia Localizzata, una fase precoce infiammatoria e una successiva fase fibrotica. Le lesioni precoci della pelle sono caratterizzate da fasci di collagene addensati nel derma reticolare che corrono paralleli alla superficie della pelle e dalla presenza di densi infiltrati infiammatori tra i fasci di collagene e intorno ai vasi sanguigni e alle ghiandole sudoripare. I linfociti sono i componenti principali dell'infiltrato infiammatorio, ma possono essere presenti anche plasmacellule, istiociti e granulociti eosinofili.

L'epidermide sovrastante può essere sana oppure sottile e atrofica.

Nello stadio fibrotico avanzato, la cute lesa diventa relativamente avascolarizzata e spesso ci sono solo deboli evidenze dell'infiammazione in corso. Le lesioni tardive solitamente contengono fibre di collagene strettamente impaccate e altamente eosinofile. Le ghiandole sudoripare sono atrofiche o assenti. Il collagene può rimpiazzare le cellule adipose nel tessuto sottocutaneo.

1.1.4. Caratteristiche Sierologiche

Nella SSc, come detto precedentemente, esistono anticorpi altamente specifici sia per la forma limitata (ACA) che per la forma diffusa (ATA o anti-Scl-70). Questi parametri sono assenti (o ancora sconosciuti) nella LS. In ogni caso, a seconda del sottotipo clinico, vi è un'elevata incidenza di eventi autoimmunitari. In un range variabile tra il 20% e l'80% dei pazienti affetti da LS vengono riscontrati elevati livelli sierici di ANA, soprattutto con un pattern omogeneo. In pazienti con LS Lineare delle estremità con coinvolgimento delle articolazioni possono esserci elevati livelli del Fattore Reumatoide, e questo può correlare con i gradi clinici di artrite. Numerosi altri anticorpi, come gli anti-topoisomerasi II α , gli anti-U1 e U3 -small-nuclear-ribonucleoprotein, gli anti-MMP sono stati valutati in pazienti affetti da LS, ma il loro ruolo specifico deve ancora essere chiarito.

Numerose citochine, come il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α , e le IL-2, 4, 6, 8 e 13 e fattori solubili quali CD23 o CD30 sono stati riscontrati nel siero di pazienti affetti da LS, e alcuni di essi sembrano correlare con i diversi sottotipi e l'attività di malattia. Ma nessuno di loro ha un ruolo dimostrato nel diagnosticare attività di malattia.

1.1.5. Trattamento

Sebbene non esista un trattamento per la causa di LS, sono disponibili un'ampia gamma di trattamenti, specialmente per la fase attiva della malattia, distinguibili in topici, sistemici e fototerapia a ultravioletti (UV). La fototerapia UV e il trattamento topico sono utilizzati per le forme limitate di LS, solitamente ristrette alla cute, mentre per gli altri sottotipi di LS (generalizzata, lineare o profonda) sono necessari dei trattamenti sistemici.

La terapia topica normalmente consiste in un trattamento locale con corticosteroidi nella fase attiva della patologia.

La terapia sistemica si avvale anch'essa dell'uso di corticosteroidi, ma a livello sistemico e non topico. Tra i vari trattamenti possibili, il Metotrexate (MTX) è il farmaco più utilizzato. Esso inibisce alcune

delle citochine che giocano un ruolo centrale nelle patologie con cute sclerodermica, come IL-2, 4 e 6. Il MTX, nei casi più severi di malattia, viene utilizzato in associazione ai corticosteroidi.

Negli ultimi 20 anni numerosi studi hanno promosso l'utilizzo della fototerapia UV. Il razionale per l'uso di questa terapia è che i raggi UVB possono indurre MMP a livello interstiziale (Kreuter A. et al., 2012).

1.3. Acrodermatite Cronica Atrofizzante (ACA)

L'Acrodermatite Cronica Atrofizzante (ACA) è una manifestazione clinica tardiva della Borreliosi di Lyme (LB), una patologia infettiva multisistemica causata dal complesso *Borrelia burgdorferi* (Bb) sensu lato.

Questo patogeno può provocare sia infezioni acute che croniche. Ad oggi numerosi sono gli studi in corso per comprendere se questo può portare alla stimolazione della risposta immunitaria innata (prevalentemente attraverso la famiglia dei recettori toll-like (TLRs)) e della risposta immunitaria acquisita (attraverso la stimolazione antigene-specifica di cellule B e T), entrambe in grado di mantenere lo stato di infiammazione cronica. Inoltre recenti studi indicano un possibile ruolo giocato dai processi autoimmunitari nello sviluppo delle manifestazioni croniche della patologia.

Normalmente colpisce donne anziane, coinvolgendo la parte posteriore delle estremità distali.

Dopo una fase infiammatoria caratterizzata da gonfiore e colorazione rosso-bluastro, la pelle diventa atrofica, asciutta e rugosa, con evidenti teleangectasie e sclerosi del derma.

Questa patologia ha diverse caratteristiche che si sovrappongono con quelle dell'insufficienza venosa cronica, caratterizzata da vene varicose, colorazione rosso-bluastro, infiammazione cronica del derma e del sottocute con eczema secondario, iperpigmentazione, sclerosi del derma e ulcere agli arti inferiori.

Le caratteristiche modificazioni istopatologiche dell'ACA includono:

- Infiltrato infiammatorio superficiale e profondo perivascolare e del derma interstiziale, composto da linfociti, istiociti e plasma cellule;
- derma atrofico con diminuzione di numero e dimensione di strutture annesse;
- assottigliamento dell'epidermide con creste appiattite;
- edema a livello del derma con dimensioni variabili;
- tra il 10 e il 20% dei casi di ACA l'aumento localizzato di collagene a livello del derma porta alla formazione di noduli fibrotici justa-articolari e/o a indurimento a fascia, che possono limitare il movimento delle articolazioni.

Le complicanze extracutanee includono motoneuropatia o polineuropatia circa nel 60% dei casi, sublussazione o lussazione delle piccole articolazioni delle mani o dei piedi, artrite a livello delle grandi articolazioni, borsite e tendine d'Achille.

A causa del decorso progressivo e delle potenziali complicanze extracutanee, una diagnosi e un trattamento precoci sono essenziali, ma purtroppo questa patologia non ha particolari aspetti clinici e

nella maggioranza dei casi si ha una storia negativa di puntura di zecca o di eritema “migrante” nel sito in cui la patologia si manifesta.

La diagnosi quindi viene normalmente supportata da elevati livelli di anticorpi anti-Bb nel siero dei pazienti e dall'esaminazione istopatologica della cute lesa, che mostra infiltrato infiammatorio e atrofia, così come degenerazione e marcata diminuzione di fibre elastiche e del collagene negli stadi avanzati della patologia.

La terapia normalmente consiste nella somministrazione di antibiotici diversi a seconda della fase della patologia, che solitamente non permettono la formazione di recidive, a parte nel caso in cui vi sia una ulteriore puntura di zecca (Tee SI et al., 2012; Zalaudek I et al., 2005; Nau R et al., 2009).

1.4. Fascite Eosinofila (EF) o di Shulman

La Fascite Eosinofila (EF) è una patologia rara ad eziologia sconosciuta del tessuto connettivo caratterizzata da gonfiore doloroso simmetrico con conseguente indurimento e ispessimento della cute e dei tessuti molli.

Nel 1974 Shulman ha descritto i primi casi di EF e li ha definiti come modificazioni simili alla sclerodermia associati a eosinofilia periferica, ipergammaglobulinemia e elevato grado di sedimentazione degli eritrociti (ESR).

Non ci sono criteri diagnostici internazionali per la diagnosi di EF, che normalmente si basa sull'associazione di anomalie caratteristiche della cute o del sottocute e sulla presenza di una fascia ispessita con infiltrato infiammatorio costituito prevalentemente da linfociti e eosinofili.

L'esordio della patologia può essere caratterizzato da perdita di peso (26%), astenia (38%) e mialgia spontanea o indotta (67%). L'anamnesi può evidenziare una storia recente di intenso sforzo fisico o di un trauma nel 30-46% dei pazienti.

1.1.1 Manifestazioni cutanee di EF

Al momento della diagnosi l'interessamento cutaneo è descritto nel 90% dei casi, e include edema, indurimento e pelle a buccia d'arancia con iperpigmentazione a livello dei polpastrelli. Inizialmente le estremità distali possono essere colpite da gonfiore e rigidità prima di evolvere nell'indurimento.

Inoltre un aspetto a forma di scanalatura delle vene è presente in circa il 50% dei pazienti e sembra essere indizio di una fibrosi profonda o di fascite.

Le estremità superiori sono coinvolte circa nell'88% dei casi, mentre quelle inferiori nel 70%. Altre localizzazioni sono possibili, anche se meno frequenti, e includono il collo (6-18%) e il tronco (17-32%). Un terzo dei pazienti presenta Sclerodermia Localizzata (ISSc o Morphea). Raramente di può avere anche il fenomeno di Raynaud, ma la capillaroscopia non mostra alterazioni.

Anche se la Fascite di Shulman è una patologia simmetrica, è possibile che si presenti unilateralmente.

Virtualmente ogni parte del corpo potrebbe essere coinvolta, ma le parti distali sono le più interessate. Le parti del corpo interessate meno di frequente sono l'addome (23%), il torace (17%), la schiena (6%) o il collo (6%).

1.1.2 Caratteristiche biologiche di EF

L'eosinofilia periferica è presente nel 63-93% dei pazienti, ma non è necessaria per la diagnosi di EF. Inoltre il livello di eosinofilia non correla con la severità della patologia e alcuni pazienti possono presentare indurimento progressivo della cute nonostante le analisi di laboratorio siano normali.

È frequente la presenza di infiammazione con elevati livelli di proteina C reattiva (55% dei pazienti), elevato ESR nel 29-63% dei pazienti e ipergammaglobulinemia in più del 50% dei pazienti.

Anticorpi anti-nucleo (ANA) possono essere riscontrati nel 15-20% dei soggetti, mentre gli anticorpi anti-DNA e anti-antigene nucleare estraibile (ENA) devono essere negativi.

Infiltrati perivascolari sono presenti nella maggior parte dei casi (>95%), e sono composti principalmente da cellule T CD8+ con un rapporto CD4/CD8<1. Infiltrati eosinofili sono presenti nel 69-75% dei casi (Lebeaux D et al., 2012; Moulin C et al. 2009).

1.5. Malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD)

La GVHD è una comune causa di morbidità e mortalità in seguito a trapianto allogenico di cellule staminali (HCT), con circa il 50-60% di soggetti che sopravvivono a lungo termine all'HCT che sviluppano una o più manifestazioni della patologia.

La forma acuta si manifesta entro giorni o settimane dal trapianto. Ogni organo può esserne colpito, ma le manifestazioni predominanti coinvolgono il sistema immunitario e gli epiteli della cute, del fegato e dell'intestino. Gli individui colpiti sono immunodepressi e facile preda delle infezioni, in particolare da citomegalovirus. Questo provoca spesso l'attivazione di infezioni precedentemente silenti. Il coinvolgimento della cute nella GVHD si manifesta sotto forma di un'eruzione cutanea generalizzata che porta, nei casi più gravi, a desquamazione. La distruzione dei piccoli dotti biliari porta a ittero, mentre l'ulcerazione della mucosa intestinale porta a diarrea sanguinolenta. Nonostante l'entità del danno i tessuti colpiti non sono infiltrati pesantemente da linfociti. È possibile che, oltre alla citotossicità diretta da parte dei linfociti T CD8+, un danno considerevole sia causato dalle citochine rilasciate dalle cellule T sensibilizzate del donatore.

La forma cronica (cGVHD) può seguire la sindrome acuta o può apparire in maniera più insidiosa. I pazienti colpiti presentano estesi danni cutanei, con distruzione degli annessi cutanei e fibrosi del derma. Queste alterazioni ricordano quelle della SSc. Questa forma è frequente anche nel fegato, che si manifesta con ittero colestatico. Il danno alla mucosa gastroenterica può causare stenosi a livello esofageo. Il sistema immunitario è gravemente danneggiato, con involuzione del timo e deplezione dei linfociti nei linfonodi. I pazienti sono colpiti da infezioni ricorrenti e spesso fatali. La condizione di apparente autoimmunità può dipendere dall'incapacità del timo, irradiato e danneggiato, di eliminare i linfociti T potenzialmente autoreattivi che si sviluppano a partire dalle cellule staminali del donatore.

Le caratteristiche della forma cronica non sono del tutto chiare, ma alcune delle più gravi manifestazioni d'organo sono legate al mancato funzionamento degli organi stessi a causa della fibrosi. In particolare i due cambiamenti più evidenti sono legati alla fibrosi cutanea, che si risolve in modificazioni analoghe alla sclerodermia (ScGVHD) e alla sindrome bronchiolitica obliterante (BOS).

Cambiamenti estesi e di tipo sclerodermico con coinvolgimento del tessuto sottocutaneo profondo o superficiale sono presenti in circa il 4-13% dei pazienti con cGVHD, e possono essere rappresentate manifestazioni letali.

La forma ScGVHD della cute è caratterizzata da infiammazione e fibrosi progressiva del derma e dei tessuti sottocutanei. Questi cambiamenti possono assomigliare alle caratteristiche della Morphea, della SSc o della Fascite di Shulman e possono o meno manifestarsi nel contesto di GVHD epidermica. Quando la forma di ScGVHD è severa, può manifestarsi anche con contratture, deperimento e riduzione delle pareti del torace. Inoltre ulcere cutanee e rallentata guarigione delle ferite in associazione a fibrosi della pelle possono essere causa di morbidità e aumentare il rischio di infezioni.

La ScGVHD risponde debolmente agli interventi topici ed è spesso resistente alle terapie sistemiche. Numerose terapie sono state testate, tra cui inibitori della calcineurina, steroidi, antimetaboliti, agenti biologici e idrossiclorochina. Le risposte, se presenti, normalmente sono poco evidenti e lente.

I fattori di rischio, i marcatori clinici e i meccanismi di sviluppo della ScGVHD rimangono tutt'ora sconosciuti, nonostante l'elevata morbidità della patologia.

Il dosaggio di CD31 nel trapianto, l'eosinofilia e la positività per gli ANA sono stati proposti come marker di ScGVHD.

Attualmente i pazienti affetti da ScGVHD sono trattati con Imatinib Mesylate, un inibitore delle tirosin chinasi (TKI) con attività biologica contro le vie di segnale sia del PDGF che del TGF- β , citochine coinvolte nella patogenesi di diverse patologie fibrosanti (Kitko CL et al., 2012).

2. LA FAMIGLIA DELLE CITOCHINE IL-17

La famiglia delle citochine IL-17 è costituita da 6 membri con diversa omologia e funzione: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (o IL-25) e IL-17F.

Queste citochine hanno un peso compreso tra i 20-30 kDa e presentano tutte 4 residui cisteinici conservati all'estremità C-terminale. Le citochine IL-17A e IL-17F mostrano l'omologia più marcata, e per questa ragione si pensa che utilizzino le stesse vie di segnale.

Le funzioni delle citochine IL-17B e C sono poco note, ma ci sono evidenze sul loro ruolo regolatorio nella risposta infiammatoria.

IL-25 mostra la minor omologia con IL-17A, il che può spiegare la sua caratteristica capacità di regolazione delle risposte allergiche e di tipo Th2.

Le citochine IL-17A e IL-17F sono state collegate ad una specifica linea di cellule T CD4+ dette Th17, anche se studi più recenti mostrano che queste citochine sono prodotte anche da altri tipi di cellule T

2.1. IL-17A e IL-17F

La citochina IL-17A è stata studiata intensivamente a partire dalla sua scoperta nel sangue periferico umano. La sua identificazione ha portato anche alla scoperta di una sottopopolazione di cellule T dette Th17 in grado di produrre sia IL-17A che IL-17F. Il differenziamento di cellule T CD4+ native in Th17 è determinato dalla presenza di particolari stimoli, tra cui il TGF- β , l'IL-6, l'IL-1 β e l'IL-23.

Entrambe le citochine normalmente formano degli omodimeri, ma è stato dimostrato che sono in grado di formare anche degli eterodimeri, vista la loro elevata omologia. Sia gli omodimeri che gli eterodimeri legano con alta affinità due diverse isoforme dei loro recettori localizzate ubiquitariamente. L'omodimero IL-17A lega il recettore IL-17RA, l'omodimero IL-17F lega il recettore IL-17RC, mentre l'eterodimero lega il recettore formato dalle due subunità IL-17RA/IL-17RC (dettagli sui recettori saranno discussi più avanti).

Sia IL-17A che IL-17F utilizzano gli adattatori TRAF6 e Act1 nelle loro vie di segnale. Entrambe le citochine sono in grado di attivare diversi tipi cellulari, quali fibroblasti e cellule endoteliali con lo scopo di indurre la produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie. Sembra che IL-17F sia meno potente di IL-17A nello svolgere questa funzione. Altre citochine come il TNF- α cooperano con IL-17A nella attivazione della risposta infiammatoria. Una delle attività principali svolte dalle due citochine è quella di reclutare e attivare i neutrofili durante i processi infiammatori.

IL-17A e IL-17F svolgono anche un importante ruolo nella difesa contro le infezioni microbiche attraverso l'attivazione di cellule dell'immunità innata e attraverso il reclutamento di leucociti in sede di infiammazione.

Un altro ruolo svolto dalle due citochine è la regolazione dell'autoimmunità, poiché la disregolazione delle cellule Th17 e di altre cellule che producono IL-17A può portare a patologie severe, come la sclerosi multipla, le infiammazioni del sistema nervoso centrale e la psoriasi. (Reynolds JM et al., 2010).

IL-17A e IL-17F non sono necessariamente sempre indotte nello stesso modo. Esiste infatti uno studio pubblicato nel 2009 che mostra che l'espressione della chinasi inducibile delle cellule T (Ikt), un importante mediatore per il signaling del recettore delle cellule T (TCR), è necessaria per l'induzione di IL-17. Cellule T che non esprimono Ikt mostrano una compromessa capacità di produzione di IL-17A ma non di IL-17F. Questo è dimostrato dal fatto che il promotore di IL-17A contiene il sito di legame per Ikt, al contrario di IL-17F. (Gomez-Rodriguez J et al., 2009).

Le due citochine promuovono entrambe l'infiammazione, ma hanno funzioni effettrici differenti a seconda dell'ambiente e del tipo di danno all'ospite. Ad esempio IL-17A ha un ruolo critico nelle fasi iniziali di EAE (modello murino di sclerosi multipla), mentre IL-17F svolge un ruolo marginale. In un altro modello murino di infiammazione delle vie aeree, animali non in grado di produrre IL-17F presentano una diminuzione dell'espressione di CXCL5 (chemochina che stimola la chemotassi dei neutrofili), con la conseguente diminuzione di neutrofilia. Animali non in grado di produrre la citochina IL-17A hanno, al contrario, una normale produzione di CXCL5.

Le citochine IL-17A e IL-17F sono prodotte principalmente dalle cellule Th17. Queste cellule sono state descritte per la prima volta nel 2005 e sono implicate in diverse risposte protettive contro l'infezione da parte di funghi o batteri extracellulari.

Le citochine IL-17A e IL-17F non sono prodotte solo dalle cellule Th17, ma anche da numerosi altri tipi cellulari, come le cellule T $\gamma\delta$, le cellule che inducono il tessuto linfoide fetale (LTi), cellule Natural Killer (NK), cellule T Natural Killer (NKT) e macrofagi (Brembilla NC et al., accepted; Reynolds JM et al., 2010).

Dati di letteratura indicano aumentati livelli di Th17 nel sangue periferico di pazienti affetti da SSc, e aumentati livelli di IL-17A sono stati riscontrati nel siero di soggetti affetti da SSc. Inoltre è stata riscontrata la presenza di mRNA di IL-17A nella cute e nei polmoni di pazienti affetti da questa patologia. È stata inoltre riscontrata recentemente la presenza di cellule IL-17A positive nella cute di pazienti affetti da SSc (Truchetet ME et al., 2011; Kurasawa K et al., 2000; Murata M et al., 2008; Nakashima T et al., 2012; Truchetet ME et al., 2012, accepted).

Nonostante l'elevata omologia, la citochina IL-17F non risulta essere aumentata né nella cute né nel siero di pazienti affetti da SSc (Nakashima T et al., 2012).

La citochina IL-17A risulta avere livelli sierici aumentati in pazienti affetti da Morphea, supportando il possibile ruolo delle cellule Th17 nella patogenesi di Sclerodermia Localizzata (Furuzawa-Carballeda J et al., 2012).

Non vi sono dati di letteratura inerenti il ruolo della citochina IL-17F in pazienti affetti da Morphea.

Ad oggi nessuno studio ha indagato il ruolo o la localizzazione delle citochine IL-17A e IL-17F nella Acrodermatite Atrofizzante o nella Fascite di Shulman.

Sembra invece che sia IL-17A che IL-17F abbiano un ruolo nell'indurre la forma cutanea di GVHD in topi trapiantati con Th17 (Cheng H et al., 2012; Carvalho A et al., 2010).

2.2. IL-17B, C e D

Queste 3 citochine sono state identificate circa da una decina d'anni. Nonostante abbiano capacità simili a quelle di IL-17A e IL-17F nell'indurre la produzione di mediatori dell'infiammazione, il loro ruolo preciso rimane ancora da chiarire.

L'mRNA di IL-17B può essere riscontrato in un'ampia gamma di tessuti, quali il midollo spinale, i testicoli, lo stomaco, l'intestino, il pancreas e l'ovaio, ma le cellule che ne esprimono livelli elevati sono i condrociti e i neuroni. Come la citochina IL-25, anche IL-17B si lega al recettore IL-17RB, ma con un'affinità inferiore rispetto all'IL-25. Il meccanismo di traduzione del segnale di IL-17B/IL-17RB non è ancora noto.

IL-17C è espressa da cellule T CD4+, cellule dendritiche (DC) e da macrofagi in siti di infiammazione ma non nella maggior parte dei tessuti in condizioni basali. Questa citochina lega il recettore IL-17RE e attiva NF- κ B.

Come per IL-17B, anche IL-17D è espressa da un'ampia gamma di tessuti, mentre nelle cellule del sistema immunitario è espressa solo da cellule T CD4+ non attive e da cellule B. Il recettore per IL-17D non è ancora stato identificato.

Sia IL-17B che IL-17C sono in grado di stimolare in vitro il rilascio di TNF- α e di IL-1 β da parte della linea cellulare THP-1 e in vivo di indurre la formazione di infiltrati ricchi di neutrofili.

IL-17D induce l'espressione di IL-6, IL-8 e di GM-CSF nelle cellule endoteliali e inibisce la formazione di colonie di progenitori ematopoietici, un'attività promossa invece da IL-17A, IL-17F e IL-25 (Yamaguchi Y et al., 2007; Iwakura Y et al., 2011).

Ad oggi non vi sono dati di letteratura riguardo la localizzazione e il ruolo giocato da queste citochine nelle patologie fibrosanti cutanee prese in esame in questo studio.

2.3. IL-17E/IL-25

La citochina IL-25 è stata identificata per omologia di sequenza con le altre citochine della famiglia IL-17. Il suo ruolo è quello di promuovere eosinofilia e sembra giocare un ruolo importante nelle risposte infiammatorie di tipo Th2 nelle infezioni da parassiti così come delle patologie allergiche che coinvolgono le vie aeree.

IL-25 è espressa sia da cellule ematopoietiche che da cellule non ematopoietiche. In particolare il suo mRNA è espresso da mastociti attivati, macrofagi alveolari, microglia, eosinofili, basofili, cellule epiteliali ed endoteliali. È stata quindi dimostrata la presenza di cellule che producono IL-25 nel cervello, nell'intestino e nei polmoni.

Il meccanismo che porta alla produzione di IL-25 non è ancora stato completamente chiarito. Dati di letteratura mostrano che la sua espressione può essere indotta nell'intestino dalla presenza di patogeni; nelle cellule epiteliali polmonari può essere indotta da particolari allergeni mediante il pathway delle MAPK oppure mediante MMP7; anche infezioni virali possono indurre la produzione di IL-25 a livello delle vie aeree. Questo indica che segnali provenienti dagli stessi patogeni possono indurre direttamente la produzione di IL-25.

Il recettore che lega IL-25 è lo stesso che lega IL-17B, IL-17RB, ma è stato dimostrato che la forza di legame tra il recettore e IL-25 è maggiore rispetto a quella tra il recettore e IL-17B. Il recettore IL-17RB non è sufficiente per l'attività di IL-25. È infatti necessaria un'interazione tra i recettori IL-17RA e IL-17RB.

Il target tipico di IL-25 è rappresentato dalle cellule ematopoietiche; questa citochina è in grado di indurre la produzione di citochine di tipo Th2 oltre ad indurre una polarizzazione delle cellule T native verso un fenotipo Th2. Ad oggi è noto che cellule sia del sistema immunitario innato che adattativo sono potenziali target per IL-25.

Dati di letteratura indicano che sia in modelli murini che nell'uomo IL-25 ha un ruolo nella patogenesi delle patologie allergiche polmonari. Studi su modelli murini, indicano inoltre che l'espressione di IL-25 ha un ruolo protettivo nelle infezioni da parassiti elmintici (Reynolds JM et al., 2010).

Ad oggi non vi sono dati di letteratura riguardo la localizzazione e il ruolo giocato da queste citochine nelle patologie fibrosanti cutanee prese in esame in questo studio.

3. LA FAMIGLIA DEI RECETTORI DELLE CITOCHINE IL-17

La famiglia dei recettori IL-17R comprende 5 subunità recettoriali, IL-17RA, RB, RC, RD e RE. Tutte le subunità tranne la RA mappano sul cromosoma umano 3. Tutte sono costituite da un unico dominio transmembrana, con un dominio extracellulare e uno citoplasmatico conservati. Sebbene ancora non sia chiaro come le varie subunità interagiscano tra loro, sembra che IL-17RA sia la subunità di signaling più comune usata da più ligandi.

Nella figura seguente sono illustrate le diverse isoforme della citochina IL-17, i loro recettori e le vie di trasduzione del segnale delle due isoforme più studiate, l'IL-17A e l'IL-17F.

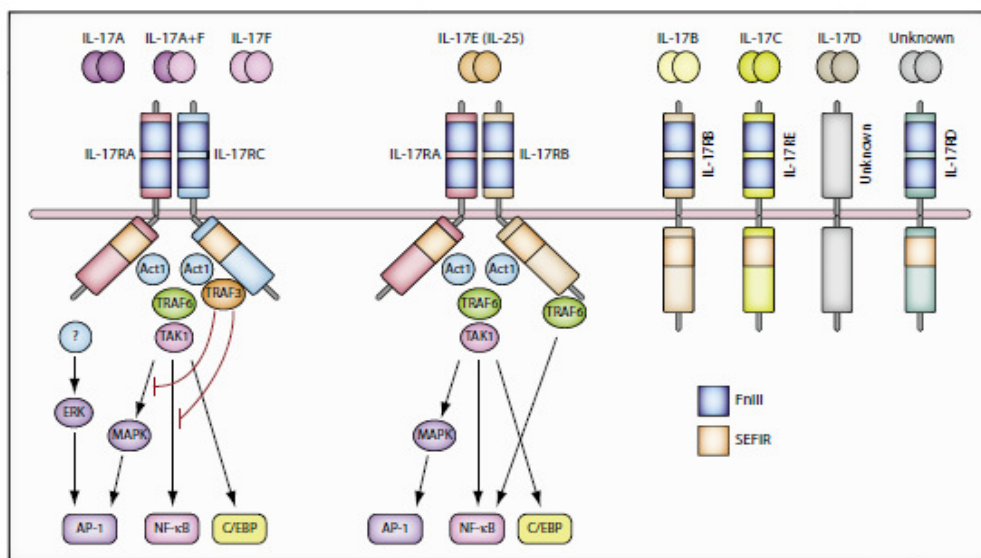


Figura tratta da Iwakura Y. et al., 2011

3.1. IL-17RA

Inizialmente identificato solo come recettore di IL-17A, oggi è noto essere in grado di legare anche IL-17F, anche se debolmente; è inoltre necessario per mediare la trasduzione del segnale dell'omodimero IL-17A, dell'omodimero IL-17F e dell'eterodimero IL-17A/IL-17F. Dati di letteratura indicano che la concentrazione di questa subunità recettoriale è troppo bassa per mediare le risposte indotte dai ligandi. Questo indica che un'altra subunità è coinvolta nella trasduzione del segnale. Infatti IL-17RA trasduce il segnale sia di IL-17A che di IL-17F in associazione a IL-17RC. IL-17RA può legarsi anche a IL-17RD, ma non è ancora stato identificato un ligando per questo recettore.

IL-17RA è espresso ubiquitariamente. I livelli più alti sono riscontrati nei tessuti ematopoietici. Questa espressione è curiosa, poiché le principali risposte indotte da IL-17A avvengono a livello di cellule epiteliali, endoteliali e fibroblasti, sebbene anche macrofagi e cellule dendritiche siano responsive.

Nonostante la diffusione ubiquitaria di IL-17RA, questa subunità recettoriale può essere dinamicamente regolata. Ad esempio sia IL-15 che IL-21 up-regolano la sua espressione in cellule T CD8+, mentre la "phosphoinositide 3-kinase" (PI3K) limita l'espressione di IL-17RA nelle cellule T. Questo può avere un significato biologico, poiché il signaling indotto da IL-17A correla strettamente con l'espressione di IL-17RA.

L'interazione tra IL-17A e IL-17RA induce l'attivazione di NF- κ B, un fattore di trascrizione chiave dell'infiammazione, di diverse MAPK, tra cui ERK e del pathway di STAT.

3.2. IL-17RC

Questa subunità è necessaria per il signaling mediato da IL-17A e IL-17F, ma la sua presenza è insufficiente alla trasduzione del segnale se manca IL-17RA. Sebbene IL-17A richieda la presenza di entrambe le subunità recettoriali per funzionare correttamente, dati di letteratura indicano che esse hanno una espressione tissutale differente. IL-17RC, in contrasto con IL-17RA, è espressa a bassi livelli nei tessuti ematopoietici e ad alti livelli in cellule non immunitarie di prostata, fegato, rene, tiroide e articolazioni.

Mentre IL-17RA lega con maggiore affinità IL-17A rispetto a IL-17F, IL-17RC lega con maggiore affinità IL-17F rispetto a IL-17A. questo può spiegare la differente localizzazione tissutale delle due subunità recettoriali.

Ancora non sono note le modalità con cui questa subunità media la trasduzione del segnale.

3.3. IL-17RB

Questa subunità è in grado di legare sia IL-17B che IL-25. È espressa in diversi tessuti endocrini, nel fegato e da cellule Th2.

Recenti dati di letteratura indicano che questa subunità è in grado di accoppiarsi con la subunità RA per formare il complesso IL-25R, ma non è noto il contributo di ogni subunità alla trasduzione del segnale.

IL-25 attiva NFATc1 e JUNB, portando all'aumento di espressione di IL-4 da parte di cellule Th2.

3.4. IL-17RD

Questa subunità non ha ancora un ligando noto. Identificato per la prima volta in zebrafish, sembra essere il componente più antico di questa famiglia di recettori.

Nell'uomo sembra inibire l'attivazione di ERK, ma non sono ancora state descritte le modalità con cui ciò avvenga.

È stata descritta la capacità di questa subunità di formare omodimeri, ma non è noto se essi siano o meno funzionali. IL-17RD è in grado anche di interagire con IL-17RA, ma anche in questo caso non è noto il significato di questa interazione.

3.5. IL-17RE

Questa subunità è stata l'ultima ad essere identificata, ma è già noto che il suo ligando è rappresentato dalla citochina IL-17C (Gaffen SL, 2009).

4. CITOCHINE CORRELATE A IL-17: IL-22, IL-4 E IFN- γ

4.1. IL-22

IL-22 è un membro della famiglia della citochina IL-10, famiglia che comprende anche IL-10, IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28 α e IL-29. Queste citochine appartengono tutte alla stessa famiglia in base alla loro omologia di struttura, di geni codificanti, e di recettori usati.

Questa citochina è prodotta tipicamente da cellule Th22 in assenza di IL-17 e IFN- γ . Queste cellule esprimono le chemochine CCR4, CCR6 e CCR10, ma non CXCR3. I fattori di trascrizione impegnati nella polarizzazione delle cellule T verso il fenotipo Th22 non sono ancora noti, sebbene sia stato proposto un ruolo sia per il recettore AhR che per STAT3.

IL-22 non ha un ruolo nella comunicazione tra le cellule immunitarie, poiché cellule di origine ematopoietica non esprimono il suo recettore (IL-22R1). Questa citochina agisce soprattutto sulle cellule epiteliali di origini mucose e sulla cute, dove promuove la difesa contro agenti microbici, la protezione contro il danneggiamento della cute stessa, l'omeostasi e la rigenerazione epiteliale.

Il recettore IL-22R1 è espresso anche a livello dei cheratinociti e, in misura minore, anche dei fibroblasti.

IL-22 può essere coinvolta nella patogenesi di numerose patologie immunitarie, tra cui l'artrite reumatoide, il lupus sistemico eritematoso (SLE) e l'asma allergico; le cellule Th22 sembrano essere aumentate in patologie infiammatorie della cute, tra cui la psoriasi e la dermatite atopica (Wolk K et al., 2010; Brembilla NC et al., accepted).

Poche sono le conoscenze relative al ruolo giocato dalle cellule Th22 e dalla citochina IL-22 nella fibrosi. Recentemente è stato dimostrato che, oltre alle cellule Th2 e Th17, anche le cellule Th22, definite come CD4+, IL-22+, IL-17-, INF- γ - e IL-4-, sono aumentate nel sangue periferico di pazienti affetti da SSc (Truchetet ME et al., 2011).

Un altro studio ha confermato che il trascritto di IL-22 è significativamente più abbondante nella cute di pazienti affetti da SSc rispetto ai controlli (Mathian A et al., 2012).

È quindi plausibile che le cellule Th22 giochino un ruolo nella fibrosi attraverso la produzione di IL-22.

Non vi sono invece dati di letteratura riguardo il ruolo dell'IL-22 e delle Th22 nella Sclerodermia Localizzata, nell'Acrodermatite atrofizzante e nella Fascite di Shulman.

Uno studio sperimentale sui topi indica che l'assenza della citochina IL-22 determina un aumento della patologia GVHD a livello dell'intestino, ma non ha alcun effetto sulla forma cutanea della malattia (Hanash AM et al., 2012).

4.2. IL-4

IL-4 è una citochina pleiotropica multifunzionale prodotta soprattutto da cellule T attivate, ma anche da mastociti, basofili e eosinofili.

Questa citochina ha un peso molecolare che varia tra i 12 e i 20 kDa, variazione che è il risultato di una variabile glicosilazione. IL-4 mostra omologia di sequenza, recettori di superficie, signaling intracellulare e parziali effetti funzionali analoghi all'interleuchina 13.

A livello funzionale la citochina IL-4 è conosciuta soprattutto per definire il fenotipo dei linfociti T Th2 e inibire la formazione di un fenotipo Th1 o Th17.

IL-4 svolge inoltre numerose altre funzioni. In particolare regola la proliferazione cellulare, l'apoptosi e l'espressione di numerosi geni in vari tipi cellulari, come i linfociti, i macrofagi, i fibroblasti e le cellule endoteliali e epiteliali (Luzina IG et al., 2012).

Non vi sono dati chiari in letteratura che indichino un ruolo diretto giocato dalla citochina IL-4 nella SSC, nella Morphea, nella Fascite di Shulman e nella GVHD.

È stato dimostrato invece che la citochina IL-4 è presente in fase tardiva di Acrodermatite, e diminuisce la probabilità di sviluppare la forma cronica della patologia (Widhe M et al., 2004).

4.3. INF- γ

L'INF- γ è una citochina fondamentale sia per l'immunità innata che per quella adattativa nelle infezioni contro batteri o virus. L'espressione aberrante di questa citochina è associata a un elevato numero di patologie autoimmuni. La sua importanza nel sistema immunitario è data in parte dalla sua abilità nell'inibire direttamente la replicazione virale, e in parte dai suoi effetti immunostimolatori e immunomodulatori (Schoenborn JR et al., 2007).

Le risposte all'INF- γ sono attivate dall'interazione con un recettore eterodimerico costituito dal recettore dell'interferon gamma 1 (IFNGR1) e dal recettore dell'interferon gamma 2 (IFNGR2). Il legame con il recettore attiva il pathway JAK-STAT.

A differenza di INF- α e INF- β che sono espressi da tutti i tipi cellulari, INF- γ è secreto solo dalle cellule T Th1, dalle cellule T citotossiche e dalle cellule Natural Killer (NK).

Questa citochina ha proprietà antivirali, immunoregatorie e anti-tumorali. È in grado di alterare la trascrizione di circa 30 geni diversi determinando una grande varietà di risposte fisiologiche e cellulari.

Alcuni degli effetti provocati dall'INF- γ sono:

- promozione dell'attività delle cellule NK;
- aumento della attività dei macrofagi (presentazione dell'antigene attività lisosomiale);
- attivazione dell'enzima Ossido Nitrico Sintasi inducibile (iNOS);
- induzione della produzione di IgG2a e IgG3 da parte di cellule B attivate;
- promozione del differenziamento delle cellule T in Th1 e soppressione del differenziamento nel fenotipo Th2;
- aumento dell'espressione di molecole MHC di classe I nelle cellule normali e di classe II sulla superficie di cellule presentanti l'antigene;

- promozione dell'adesione e del legame necessario alla migrazione leucocitaria.

L'INF- γ è la citochina principale che definisce le cellule T con fenotipo Th1 (Schroder K et al., 2004).

Numerosi studi indicano che la citochina INF- γ è espressa a livelli diminuiti in pazienti affetti da SSc (Matsushita T et al., 2006).

Non vi sono ad oggi studi che indichino un diretto coinvolgimento della citochina nella patogenesi di Sclerodermia Localizzata o di Fascite di Shulman.

INF- γ sembra avere un ruolo nella forma cronica di Acrodermatite Atrofizzante, poiché alti livelli di questa citochina sono riscontrati nelle fasi iniziali della patologia cronica (Widhe M et al., 2004).

È stato recentemente dimostrato che il trapianto di midollo osseo da parte di un donatore con bassi livelli di FN- γ induce un'aumentata produzione nell'ospite di cellule Th17, con una conseguente amplificazione della patologia GVHD polmonare. Non vi sono dati in letteratura riguardo il ruolo di questa citochina nella forma cutanea di GVHD (Sun K et al., 2012).

5. CENNI DI MICROSCOPIA

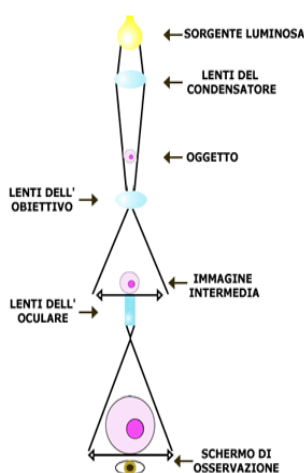
5.1. Microscopio ottico e digitale

Il microscopio ottico funziona sfruttando l'interferenza e la diffrazione ottica della luce che illumina il campione da analizzare.

Il microscopio ottico è costituito da:

1. una sorgente di luce, che può essere sia esterna che inserita all'interno della sua base;
2. un condensatore, che concentra i raggi diffusi dalla sorgente di luce e illumina il campione;
3. le lenti dell'obiettivo che raccolgono i raggi luminosi concentrati sul campione dal condensatore e mettono a fuoco i raggi che passano attraverso il campione per formare un'immagine reale e ingrandita dell'oggetto illuminato;
4. la lente oculare che riceve l'immagine dalle lenti dell'obiettivo e crea una immagine ingrandita virtuale.

L'ingrandimento totale dato dal microscopio è dato dal prodotto degli ingrandimenti dell'obiettivo e dell'oculare.



Un parametro molto importante per descrivere la "potenza" di un microscopio è la risoluzione. Più elevato sarà il potere di risoluzione, più ingrandita potrà essere l'immagine mantenendo chiarezza di dettaglio. La risoluzione dipende dalla sorgente di luce, per cui il microscopio ottico ha una risoluzione di circa 0,2 micrometri.

Diverse sono le tipologie di microscopio ottico esistenti:

1. Microscopio a campo chiaro. Nel microscopio ottico a campo chiaro la luce della sorgente di illuminazione converge sul preparato attraverso il condensatore. I campioni analizzati attraverso il microscopio a campo chiaro vengono spesso colorati, poiché il basso contrasto rende il campione poco visibile.
2. Microscopio a contrasto di fase. Esso si basa sull'incremento delle differenze di contrasto tra il campione da analizzare e il mezzo circostante, in modo tale da consentirne la visualizzazione senza

ricorrere a metodologie di colorazione. Il principio alla base di questo tipo di microscopia è che il campione, per esempio un preparato di cellule, ha un indice di rifrazione differente dal mezzo circostante e quando la luce lo attraversa viene deviata e ritardata. L'obiettivo del microscopio a contrasto di fase amplifica questo effetto e porta alla formazione di una immagine scura su campo chiaro.

3. Microscopio a campo scuro. Il microscopio a campo scuro ha un sistema di illuminazione modificato che raggiunge il preparato lateralmente. In questo modo l'unica luce che raggiunge l'obiettivo è quella riflessa dal campione, che appare quindi chiaro in un campo scuro.

Per parte di questo studio è stato utilizzato un microscopio ottico a campo chiaro e un particolare tipo di microscopio ottico chiamato Mirax-Midi System.

5.2. Microscopia virtuale

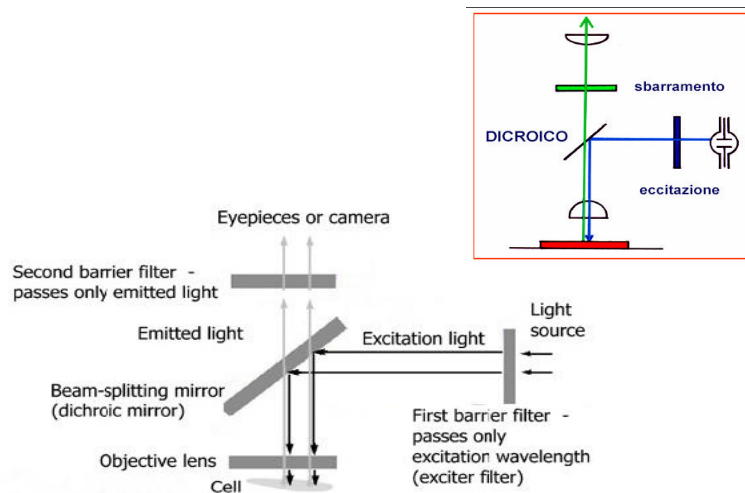
La microscopia virtuale è una procedura digitale in grado di fornire un'alternativa realistica all'esaminazione delle slide con l'uso di un normale microscopio ottico.

L'uso di uno scanner, come l'apparecchiatura Zeiss Mirax-Midi System usata per questo progetto, permette di digitalizzare automaticamente le sezioni istologiche. In questo modo le immagini possono essere successivamente visionate su uno schermo a tutti gli ingrandimenti necessari. Per questa ragione le slide virtuali sono file molto grandi e particolari software (noti come microscopi virtuali) sono necessari per visualizzarlo. Il programma utilizzato per visualizzare le slide virtuali ottenute con il Mirax-Midi e per esportarle in qualsiasi altro formato necessario è il Mirax-Viewer.



5.3. Microscopio a fluorescenza

Il microscopio a fluorescenza è un particolare microscopio ottico, in grado di eccitare i campioni a determinate lunghezze d'onda λ_a e rilevarne l'emissione ad energie inferiori λ_e . Esso, come ogni microscopio ottico, è costituito schematicamente da una fonte luminosa e almeno due sistemi di lenti: gli oculari e l'obiettivo. I microscopi a fluorescenza si basano, però, sul principio dell' "epi-illuminazione" (illuminazione dall'alto). L'obiettivo, quindi, funge anche da condensatore, grazie ad una lente che è in grado di riflettere la luce proveniente dalla sorgente, ma è trasparente per quella derivante dal campione.



Schema di un microscopio a fluorescenza

Le sorgenti luminose, utilizzate nella tecnica dell'immunofluorescenza, devono essere in grado di eccitare le molecole marker a lunghezze d'onda inferiori a quelle del visibile. La luce, proveniente dalla sorgente luminosa, passa attraverso uno speciale filtro (filtro di eccitazione), che seleziona dallo spettro della luce bianca le radiazioni delle intensità desiderate, λ_a . Le onde, ora monocromatiche, entrano nel cammino ottico, dove vengono deviate da uno specchio dicroico (dispositivo trasparente solo per determinate radiazioni e riflettente le altre) e, passando attraverso il sistema di lenti dell'obiettivo, colpiscono il campione. A questo punto, le onde trasmettono parte della propria energia al fluorocromo, con cui il campione era stato precedentemente marcato, e passano a lunghezze d'onda inferiori λ_e . Tornano quindi indietro, superando lo specchio dicroico. Le onde λ_e incontrano, dunque, il filtro di osservazione, che le seleziona, impedendo il passaggio di tutte le altre radiazioni prodotte dal resto del campione. L'analisi, dopo l'attraversamento del sistema di lenti degli oculari può essere fatta da un osservatore o da un sensore CCD, che trasmette le immagini raccolte ad un computer.

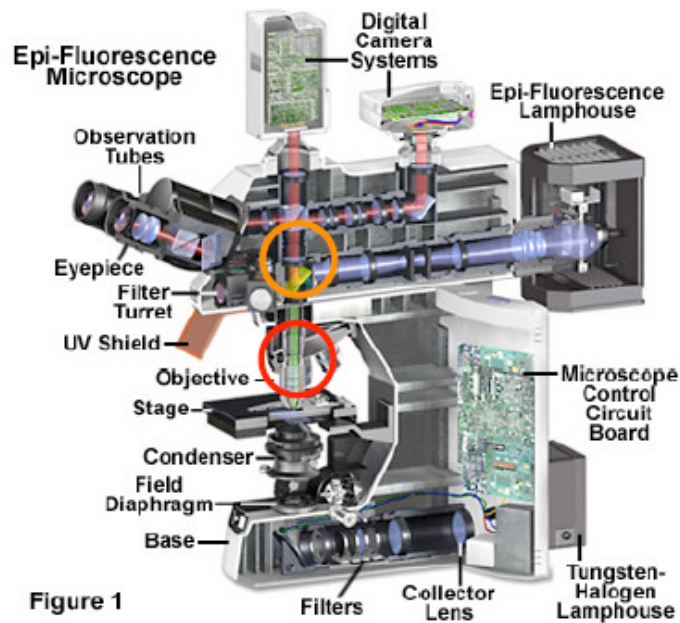
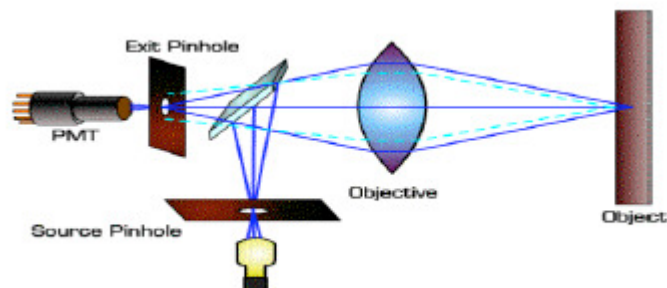


Figure 1

microscopio a fluorescenza

5.4. Microscopio confocale



Il microscopio confocale si basa sull'utilizzo di un unico obiettivo, che permette l'illuminazione e l'osservazione del medesimo punto sul campione. In altre parole, viene utilizzato lo stesso fuoco per la luce che colpisce il campione e per il segnale in fluorescenza che il campione emette.

Questo è possibile grazie alla separazione cromatica del segnale di eccitazione e di emissione mediante uno specchio dicroico.

Tale strumento ha in ingresso e in uscita un forellino chiamato pinhole, che permette di illuminare solo una zona molto limitata del campione e di raccogliere solo la luce proveniente da essa.

L'immagine non viene, quindi, disturbata da indesiderate riflessioni o fluorescenze da parte dei piani non a fuoco e dai punti del piano, a fuoco, che non vengono osservati.

Il fascio di eccitazione attraversa il pinhole, avvicinandosi così ad una sorgente puntiforme e illuminando, quindi, solo una piccolissima regione dell'oggetto.

Prima del rivelatore una seconda apertura confocale attenua i contributi dei piani sopra e sottostanti quello a fuoco.

Con tecniche a scansione, poi, si può studiare l'intera superficie. Il principio basilare della scansione è quello di illuminare un punto del campione alla volta; il segnale risultante dall'interazione tra la radiazione incidente e il campione viene registrato ed elaborato per formare una riproduzione dell'oggetto in esame, punto per punto.

Come sorgente di eccitazione è generalmente usato un raggio laser.

Il segnale elettrico in uscita viene digitalizzato e inviato ad un computer, che registra i valori di intensità misurati per ogni punto. Questi valori vengono utilizzati per ricostruire l'immagine a video: ogni punto del campione verrà a corrispondere ad un pixel dello schermo. L'accostamento di tutti i singoli pixel corrispondenti ai punti scanditi dal fascio laser nel campione darà così l'immagine finale. Spostandosi lungo l'asse verticale del campione, dopo ogni scansione, è possibile eseguire serie di scansioni successive corrispondenti a piani focali via via più profondi all'interno del campione stesso. Queste scansioni prendono il nome di sezioni ottiche e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.

Figure dal sito www.microscopyu.com

SCOPO DELLO STUDIO

La fibrosi è una complessa risposta tissutale a diversi eventi patologici ed è caratterizzata principalmente da un'eccessiva produzione matrice extracellulare (ECM), e in particolare da collagene. Nella maggior parte dei casi la fibrosi può essere vista come un processo volto alla riparazione del danno tissutale, che per varie e poco chiare ragioni non viene controllato né portato a termine nel modo corretto. È altamente probabile che l'infiammazione giochi un ruolo nell'avvio o nel mantenimento dei processi che portano alla fibrosi. Infatti le fasi iniziali della fibrosi sono caratterizzate dalla presenza di infiltrato infiammatorio, e le cellule infiammatorie possono modificare in modo evidente la produzione di ECM rilasciando prodotti solubili o mediante interazione diretta cellula-cellula con lo scopo di modificare il metabolismo dei fibroblasti (Chizzolini C et al., 2011).

Patologie quali la Sclerodermia, la Morphea, l'Acrodermatite Atrofizzante, la Fascite di Shulman e la GVHD sono caratterizzate tutte da una forma di fibrosi.

Inoltre recenti dati di letteratura indicano aumentati livelli di Th17 nel sangue periferico di pazienti affetti da SSc, e aumentati livelli di IL-17A sono stati riscontrati nel siero di soggetti affetti da SSc. Inoltre è stata riscontrata la presenza di mRNA di IL-17A nella cute e nei polmoni coinvolti nella patologia. È stata inoltre riscontrata recentemente la presenza di cellule IL-17A positive nella cute di pazienti affetti da SSc.(Truchetet ME et al., 2011).

Partendo da questi presupposti lo scopo principale di questo studio è stato quello di indagare l'espressione della citochina IL-17A nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee.

Parallelamente sono state testate sulle biopsie cutanee degli stessi soggetti anche le altre isoforme della citochina IL-17, vista l'elevata omologia che le caratterizza.

Dati di letteratura indicano che la citochina IL-17A nella cute di pazienti sclerodermici è prodotta principalmente da cellule T e da Mastociti. (Truchetet ME et al., accepted)

Basandoci su questi dati il secondo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare se anche nelle altre patologie fibrosanti cutanee prese in esame le cellule responsabili della produzione di IL-17A fossero sempre cellule T e mastociti.

L'ultima parte di questo studio prevedeva infine l'analisi del ruolo delle isoforme della citochina IL-17 nella cute di pazienti affetti da SSc trattati con Iloprost o con NAC confrontando i pazienti al tempo 0 e dopo un anno di follow-up.

Questo perché è stato recentemente dimostrato che la somministrazione di Iloprost aumenta, in vitro, la risposta delle cellule Th17 isolate da pazienti Sclerodermici (Truchetet ME et al., 2012).

MATERIALI E METODI

1. INDIVIDUI

Per questo studio sono stati utilizzati campioni bioptici di cute sia di individui sani che affetti da differenti patologie fibrosanti cutanee:

- 16 soggetti affetti da SSc (diffusa o limitata) di cui 8 arruolati presso l'unità di reumatologia dell'Ospedale Gaetano Pini di Milano, 6 arruolati presso il Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona) e 2 arruolati presso l'unità di reumatologia di Napoli. I pazienti reclutati ad Ancona sono stati sottoposti ad un trattamento con Iloprost o NAC e hanno subito un prelievo bioptico il giorno del reclutamento (come i pazienti reclutati a Milano) e uno dopo 1 anno di trattamento.

- 5 soggetti affetti da Sclerodermia localizzata (morphea) presentatisi presso il servizio di dermatologia degli ospedali universitari di Ginevra;

- 2 soggetti affetti da Acrodermatite Cronica Atrofizzante presentatisi presso il servizio di dermatologia degli ospedali universitari di Ginevra;

- 1 soggetto affetto sia da Fascite di Shulmann che da Morphea presentatisi presso il servizio di dermatologia degli ospedali universitari di Ginevra;

- 1 soggetto affetto da GVH (età 49 anni) presentatosi presso il servizio di dermatologia degli ospedali universitari di Ginevra;

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a biopsia in corrispondenza di cute lesa.

Tutti i soggetti affetti da Sclerodermia corrispondono ai criteri diagnostici stilati dell'American Rheumatism Association, e sono stati classificati in base ai criteri determinati da LeRoy et al. (LeRoy EC et al., 1988).

- il gruppo di controllo è costituito da 16 soggetti sani di cui 7 sottoposti a interventi chirurgici correttivi al seno o all'addome presso il dipartimento di chirurgia plastica della Clinique de La Tour a Ginevra, 4 sottoposti a biopsia per sospette patologie cutanee ma con esito dell'esame istopatologico negativo presso la Fondazione Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano e 5 anch'essi sottoposti a biopsia per sospetta patologia cutanea (con esito negativo) presso il servizio di dermatologia degli ospedali universitari di Ginevra;

Questo studio è stato approvato dai comitati etici delle istituzioni coinvolte ed è stato condotto secondo le direttive della Dichiarazione di Helsinki.

Sono stati raccolti i consensi informati firmati da tutti i soggetti inclusi nello studio.

2. ANTICORPI E REAGENTI

2.1. Anticorpi Primari

- anticorpo policlonale anti-IL-17 umano prodotto in capra (R&D System, Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo monoclonale anti-mastociti (Triptasi) umani, clone AA1 (Dako, Danimarca, DK)
- anticorpo monoclonale anti CD3 umano (Leica, Novocastra, Newcastle, UK)
- anticorpo monoclonale anti-IL-17E/II-25 umano, clone n°182203 (R&D System Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo monoclonale anti-IL-17F umano, clone n°197301 (R&D System Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo monoclonale anti-IL-17C umano, clone n°177114 (R&D System Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo policlonale anti-IL-17 R umano prodotto in capra (R&D System Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo policlonale anti-IL-17 RC umano prodotto in coniglio (Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, CA, USA)
- anticorpo policlonale anti-IL-17 RE umano prodotto in capra (Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, CA, USA)
- anticorpo policlonale anti-IL-22 umano prodotto in capra (R&D System, Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo policlonale anti-IL-4 umano prodotto in capra (R&D System, Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo policlonale anti-Interferon(IFN)- γ umano prodotto in capra (R&D System, Minneapolis, MN, USA)

2.2. Anticorpi Secondari

- anticorpo policlonale anti-Interferon(IFN)- γ umano prodotto in capra (R&D System, Minneapolis, MN, USA)
- anticorpo policlonale anti-capra biotinilato prodotto in coniglio (DakoCytomation Danimarca, DK)
- anticorpo policlonale anti-topo biotinilato prodotto in coniglio (DakoCytomation Danimarca, DK)
- anticorpo policlonale anti-coniglio prodotto in capra biotinilato (DakoCytomation Danimarca, DK)
- anticorpo policlonale anti-capra coniugato con il fluorocromo 488 prodotto in asino (Life technologies, Paisley, UK)
- anticorpo policlonale anti-topo coniugato con il fluorocromo 568 prodotto in asino (Life technologies, Paisley, UK)
- anticorpo policlonale anti-coniglio coniugato con il fluorocromo 568 prodotto in asino (Life technologies, Paisley, UK)

2.3. Sistemi di rivelazione

- Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Peterborough, UK)
- Tiramina biotinilata (preparata miscelando una soluzione di biotina (NHS-LC-Biotina, Thermo Scientific, Rockford, IL) con tampone borato (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) alla concentrazione di 50mM a pH 8. Successivamente viene aggiunta la tiramina (Sigma, St. Louis, MO). La miscela viene lasciata agitare per 12 ore a temperatura ambiente al buio e successivamente filtrata)
- 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

3. IMMUNOISTOCHEMICA (IHC)

3.1. Preparazione delle sezioni istologiche

I campioni biotici sono stati fissati subito dopo il prelievamento in formalina al 4% e successivamente passati in alcol crescente (70, 95 e 100%) e xilolo per disidratare completamente il campione. Successivamente le biopsie sono state incluse in blocchetti di paraffina riscaldata a 85°C e lasciate solidificare a -12°C.

A partire dai blocchetti sono state tagliate fettine di 4µm di spessore utilizzando un microtomo rotativo semiautomatico e poste su vetrini trattati con silano (3-amminopropil-trieossi-silano). Le fettine sono state poi fatte asciugare completamente per circa 15 minuti su una piastra a 70°C.

3.2. Tecnica e strumenti

Le fettine sono state deparaffinate e reidratate mediante una scala alcolica discendente (xilolo, alcol 100, 95 e 70%) fino ad arrivare all'acqua. Il passaggio successivo prevede lo smascheramento degli antigeni, passaggio reso necessario dal fatto che la fissazione con aldeide formica può mascherare parte o tutta la sequenza conformazionale degli anticorpi. In letteratura non sono riportate informazioni univoche riguardo i buffer da utilizzare per gli anticorpi utilizzati in questo studio, quindi ne sono stati testati diversi, al fine di determinare quale fosse il più corretto per ogni singolo anticorpo:

- tampone citrato 10mM/EDTA 1mM pH 7,5;
- tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 8,5;
- tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 9;
- tampone EDTA 1mM pH 8;
- tampone EDTA (apposito per il coloratore automatico Benchmark XT, Roche/Ventana (Basel, CH), e fornito direttamente dall'azienda produttrice. Di questo tampone, purtroppo, non è quindi possibile avere le specifiche tecniche poiché è a marchio registrato).

I vetrini sono stati immersi nel tampone per 20 minuti a 600W utilizzando un microonde e lasciati poi raffreddare con acqua distillata corrente.

Questo passaggio è stato effettuato con un coloratore automatico sui campioni provenienti dall'ospedale di Ancona, poiché i vetrini su cui sono state montate le fettine non possono essere trattati nel microonde. L'uso dei due differenti metodi (microonde e coloratore automatico) non ha dato differenze nei risultati.

L'attività delle perossidasi endogene è stata bloccata utilizzando un tampone costituito da H₂O₂ al 3% in H₂O (preparato al momento dell'utilizzo) per 20 minuti a temperatura ambiente.

Le fettine sono state poi incubate per un'ora a temperatura ambiente con gli anticorpi primari diluiti in tampone salino (PBS) con l'aggiunta di BSA allo 0,3% e quindi per 30 minuti a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari biotinilati diluiti sempre in PBS/BSA 0,3%. La reazione è stata messa in evidenza mediante il kit Vectastain elite ABC. Il kit è costituito da due soluzioni, A e B. La soluzione C viene preparata aggiungendo a 5 mL di PBS una goccia della soluzione A e una goccia della soluzione B. Il protocollo di reazione prevede una prima incubazione di 30 minuti con 3 gocce della soluzione C,

un'amplificazione del segnale di 15 minuti con una soluzione di tiramina biotinilata, una seconda incubazione di 20 minuti con 3 gocce della soluzione C. Infine i vetrini vengono incubati con il substrato cromogeno (DAB). Le sezioni sono state contrastate con ematossilina.

I vetrini sono stati interamente scansionati utilizzando il microscopio mirax-midi scanner. Le immagini ottenute sono state poi esportate e analizzate utilizzando un'opzione (journal) appositamente realizzata a partire dal software Metamorph/metaXpress (maggiori dettagli sia del microscopio utilizzato che del software nelle sezioni dedicate).

La scelta di quale tampone utilizzare per ogni singolo anticorpo è stata fatta attribuendo un punteggio a ciascuna sezione colorata valutando 3 variabili: Specificità, Rumore di Fondo e Intensità.

Ad ogni variabile è stato attribuito un punteggio da 0 a 3, dove 0 indica il peggior risultato e 3 il migliore.

Specificità: il punteggio 3 è stato assegnato quando la presenza di colorazione era circoscritta esclusivamente ai tessuti/cellule o compartimenti sub-cellulari dove la letteratura indica la presenza dell'antigene ricercato. La comparsa di colorazione lieve, importante o aspecifica indistinguibile dalla specifica è stata valutata utilizzando rispettivamente i punteggi 2, 1 o 0.

Rumore di fondo: il massimo del punteggio è stato attribuito quando vi era assenza di colorazione distribuita uniformemente e non ricondotta a specifiche strutture isto-citologiche. La presenza di tale colorazione in forma lieve, moderata o indistinguibile dalla specifica è stata valutata come nel parametro Specificità.

Intensità: l'intensità della colorazione specifica assente, debole, media o forte è stata valutata usando i punteggi da 0 a 3.

Le immagini sono state valutate separatamente da 3 operatori. Il risultato dei punteggi ottenuti è la media delle valutazioni dei 3 operatori.

I tamponi che hanno ottenuto un punteggio ≥ 8 sono stati considerati funzionanti e utilizzabili nei vari protocolli.

4. IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IIF)

La metodica dell'immunofluorescenza richiede l'utilizzo di anticorpi e fluorocromi su cellule o tessuti precedentemente fissati e, se necessario, permeabilizzati. L'analisi necessita di speciali microscopi in grado di emettere luce a particolari lunghezze d'onda e rilevarla ad altre (microscopio a fluorescenza o confocale).

L'immunofluorescenza può essere *diretta* o *indiretta*: nel primo caso l'anticorpo che si lega all'antigene d'interesse (*anticorpo primario*) è esso stesso coniugato ad un *fluoroforo*; nel secondo caso è, invece, l'*anticorpo secondario*, ovvero quello in grado di riconoscere il primario ad essere marcato.

Per una parte di questo studio è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta, i cui vantaggi rispetto all'immunofluorescenza diretta sono principalmente tre:

- il segnale viene amplificato, poiché più anticorpi secondari possono riconoscere un unico anticorpo primario;
- un'ampia gamma di antigeni può essere rilevata utilizzando solo pochi anticorpi secondari legati a fluorocromi diversi. Questo è possibile utilizzando anticorpi primari prodotti in animali di differenti specie (topo, pecora, coniglio, ecc.) e secondari diretti contro le porzioni costanti di questi ultimi;
- si evita il rischio che gli anticorpi primari prodotti perdano sensibilità o specificità a causa del legame alla molecola fluorescente.

4.1. Tecnica e strumenti

Il protocollo prevede, in modo analogo a quello per IHC, che i vetrini vengano deparaffinati e reidratati, con successiva incubazione con tampone per lo smascheramento degli antigeni. Non è necessario in questo caso il passaggio di bloccaggio delle perossidasi endogene. Il campione viene poi incubato per un'ora con gli anticorpi primari e per 30 minuti con gli anticorpi secondari fluorescinati. Viene infine utilizzato un liquido di montaggio (mounting-medium) contenente DAPI sia per colorare i nuclei che per evitare l'effetto "bleaching", cioè che il contatto diretto tra il laser e il fluorocromo "spenga" il segnale del fluorocromo stesso.

I vetrini sono stati manualmente visionati utilizzando un microscopio a fluorescenza. Le immagini ottenute sono state esportate e utilizzate per l'analisi con un journal del software Metamorph/MetaXpress appositamente modificato. Un microscopio confocale è stato utilizzato per ottenere immagini ad alta risoluzione (maggiori dettagli sui microscopi e il software nelle sezioni dedicate).

5. MICROSCOPIA

Le immagini di immunistoichimica sono state acquisite utilizzando il microscopio Zeiss Mirax-Midi, dotato di un unico obiettivo 20X. Questo microscopio permette di avere una sola immagine relativa ad ogni vetrino visualizzato. Le immagini sono state poi manualmente divise in 3 regioni: epidermide, derma superficiale e derma profondo. Tutto il tessuto al di sotto del derma profondo non è stato analizzato. Le regioni, troppo grandi per essere analizzate, sono state poi esportate dal software Mirax-Viewer in immagini con dimensioni minori. Nello specifico ogni immagine esportata corrisponde ad un campo di 0.22mm^2 .

Le immagini di immunofluorescenza utilizzate per le analisi sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza (Zeiss Axiocam) utilizzando un obiettivo 40X. Le immagini ottenute corrispondono ad un campo di 0.44mm^2 .

Le immagini ad alta risoluzione mostrate nelle figure sono state ottenute utilizzando un microscopio confocale (Zeiss LSM 510 Meta) utilizzando gli obiettivi 40X e 63X.

6. Metamorh/MetaXpress Software (Molecular Device)

Le immagini ottenute dagli esperimenti di immunistoichimica e immunofluorescenza sono state analizzate utilizzando un software dotato di numerose funzioni, alcune delle quali permettono l'analisi di caratteristiche di base del campione tramite l'uso di funzioni predefinite, mentre informazioni più precise possono essere ottenute con la messa a punto di specifiche opzioni dette "journal".

Per questo progetto sono stati messi a punto due differenti journal, uno per l'analisi delle immagini di immunistoichimica e uno per l'analisi delle immagini di immunofluorescenza.

6.1. Journal IHC

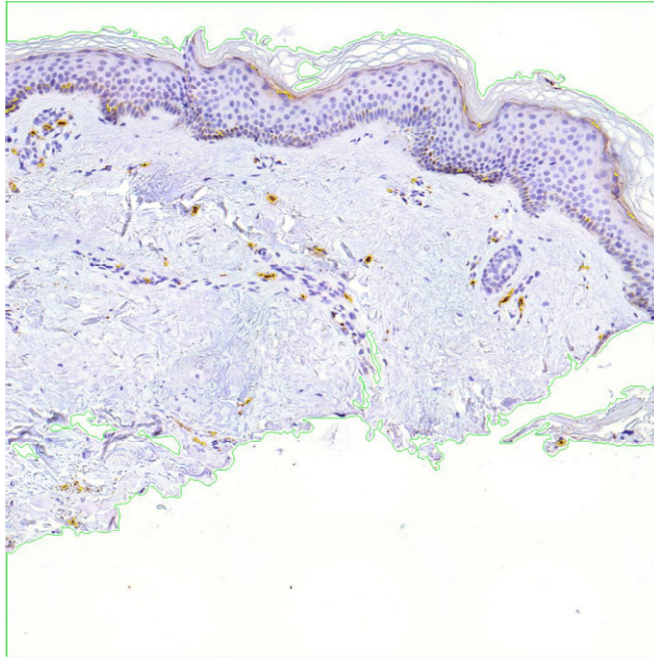
Questo journal processa immagini acquisite con lo scanner Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Il programma crea una maschera intorno ai nuclei (in blu) per creare un filtro in base alla dimensione delle cellule. La maschera viene poi utilizzata per selezionare le cellule positive per la DAB (in marrone).

L'output del journal permette di avere numerose informazioni, tra cui l'area di tessuto effettivamente presente nell'immagine esportata, il numero di nuclei presenti nell'immagine e il numero di cellule positive.

Oltre ad un file excel contenente tutte queste informazioni, il journal fornisce anche un'immagine finale in cui vengono evidenziate con una cornice verde le aree in cui non vi è tessuto, e con una cornice gialla le cellule positive.

Questo permette all'operatore di controllare tutte le immagini analizzate, verificare la bontà dell'analisi del software, e eventualmente di modificare i parametri scorretti del software stesso.

Di seguito è mostrato un esempio di immagine di immunistoichimica analizzata con questo journal.

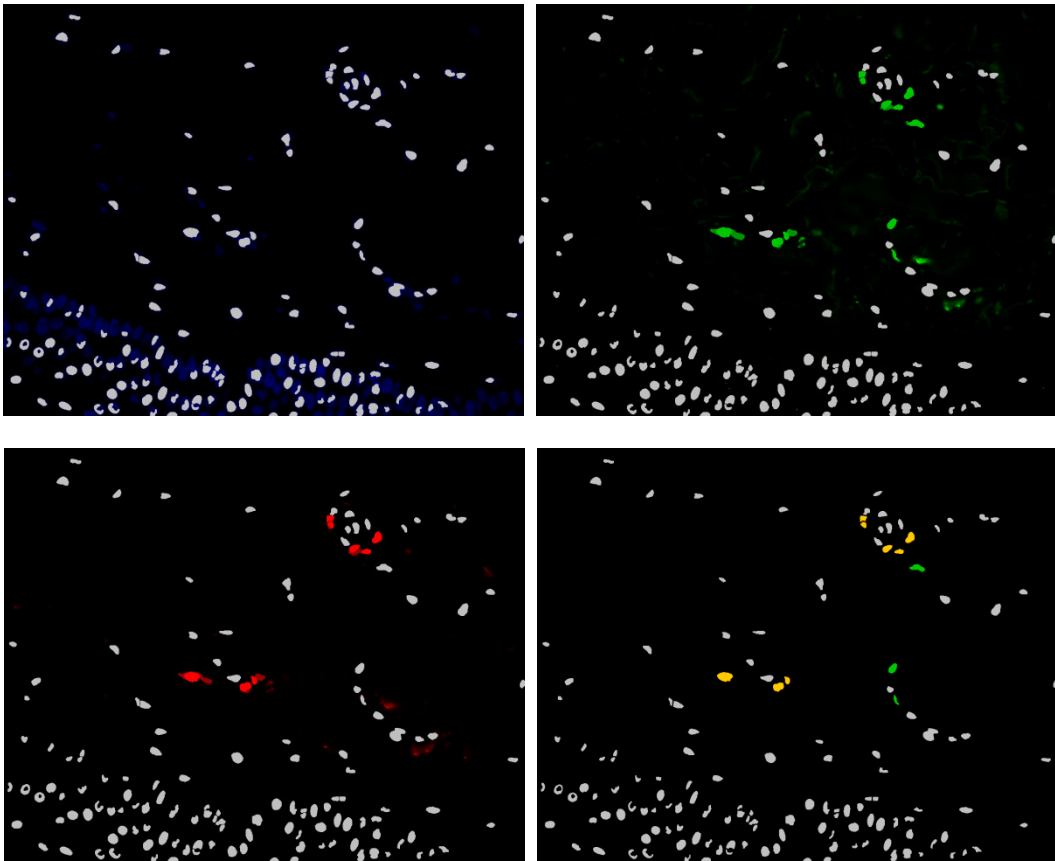


6.2. Journal IIF

Le immagini ottenute da un microscopio a fluorescenza sono state processate utilizzando un secondo journal appositamente creato.

Il journal divide l'immagine nei 3 canali (blu, rosso e verde) e crea una maschera intorno ai nuclei (canale blu) determinando un filtro per la dimensione delle cellule. Questa maschera viene poi applicata agli altri due canali ottenendo quindi un file excel che fornisce informazioni quali il numero di nuclei, il numero di cellule solo verdi, il numero di cellule solo rosse, il numero di cellule sia rosse che verdi, e il numero di cellule sia rosse che verdi. Oltre a questo file, come per il journal per IHC, anche in questo caso vengono prodotte e salvate le immagini relative alle maschere create nei vari passaggi, in modo che alla fine del processo l'operatore possa controllare manualmente la bontà del journal.

Di seguito è mostrato un esempio di immagine di immunofluorescenza analizzata con questo journal.



7. Analisi statistica

Per quanto riguarda le immagini di immunohistochimica, sono state acquisite immagini relative ad almeno 2 fettine per ogni campione. L'utilizzo del microscopio Mirax-Midi ha permesso di avere immagini relative alle intere fettine.

Per quanto riguarda invece l'analisi delle immagini di IIF, almeno 2 fettine per vetrino sono state colorate e visionate manualmente al microscopio a fluorescenza. Almeno 6 immagini da 0.44mm^2 per campione sono state analizzate.

I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad prism versione 6.0. Le popolazioni sono state confrontate usando il test non parametrico di Mann-Whitney. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Nei grafici ogni soggetto è rappresentato da un punto.

RISULTATI

1. MESSA A PUNTO DELLE COLORAZIONI DI IMMUNISTOCHEMICA PER LE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17, DEI RISPETTIVI RECETTORI E DELLE CITOCHINE CORRELATE

Il primo punto sperimentale di questo studio prevede la messa a punto di un protocollo funzionale per tutti gli anticorpi di nostro interesse.

Non essendoci informazioni univoche in letteratura, e sapendo che in immunistochemica il passaggio limitante perché il protocollo funzioni correttamente è determinato dallo smascheramento degli antigeni, gli anticorpi relativi alle diverse isoforme di IL-17 (Fig.1), quelli relativi ai recettori delle diverse isoforme di IL-17 (Fig.2) e quelli relativi alle citochine ad esse correlate (Fig.3) sono stati testati con 5 diversi tamponi. Ogni vetrino è stato poi acquisito e le immagini sono state valutate secondo la metodica precedentemente descritta (vedi materiali e metodi).

Tutti gli anticorpi sono stati testati con i diversi tamponi su fettine provenienti dalla stessa biopsia prelevata da un soggetto sano.

Nella tabella seguente sono riportati i punteggi ottenuti dagli anticorpi con i differenti tamponi. I tamponi che hanno ottenuto il punteggio più elevato (≥ 8) sono stati utilizzati per la seconda parte dello studio.

	IL-17A	IL-17-C	IL-17E/IL-25	IL-17F	IL-17R	IL-17RC	IL-17RE	IL-22	IL-4	IFN- γ
tampone citrato/EDTA pH7.5	9	5	8	0	5	1	5	4	7	3
tampone TRIS/EDTA pH8.5	9	5	5	7	3	2	4	5	5	5
tampone TRIS/EDTA pH9	7	9	7	8	7	1	2	5	8	3
Coloratore automatico	8	8	6	6	7	6	7	2	5	3
tampone EDTA pH8	7	7	5	6	3	5	5	2	5	7

Per quanto riguarda le diverse isoforme della citochina IL-17 (Fig.1), non tutti gli anticorpi funzionano correttamente con lo stesso tampone. In particolare il protocollo per gli anticorpi anti-IL-17A e anti-IL-17E prevede l'utilizzo del tampone citrato, mentre il protocollo per gli anticorpi che riconoscono le altre due isoforme di IL-17 (IL-17C e IL-17F) prevede l'utilizzo di un tampone TRIS-EDTA a pH9.

Per quanto riguarda i recettori delle diverse isoforme di IL-17 (Fig.2), purtroppo nessuno dei tamponi utilizzati ha raggiunto il punteggio minimo necessario per considerare la colorazione avvenuta con successo.

Per quanto riguarda infine le altre citochine analizzate (Fig.3), solo per l'anticorpo anti-IL-4 è stato possibile mettere a punto un protocollo corretto (che prevede l'utilizzo del tampone TRIS-EDTA pH 9), mentre gli altri anticorpi non hanno raggiunto un punteggio sufficiente per considerare il protocollo funzionante e utilizzabile.

2. LOCALIZZAZIONE DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Una volta determinato quale fosse il corretto tampone da utilizzare per gli anticorpi di nostro interesse, lo studio si è focalizzato sulla ricerca della presenza delle diverse isoforme della citochina IL-17 nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee.

Non è stato possibile portare a termine questa parte dello studio per i recettori delle diverse isoforme della citochina IL-17, per la citochina IL-22 e per l'IFN- γ poiché la prima analisi non ha dato esiti positivi, mentre l'analisi per quanto riguarda la citochina IL-4 è ancora in corso.

In Fig.4 sono illustrate immagini rappresentative della cute di pazienti affetti da Sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulmann (D) e GVHD (E) colorate per la citochina IL-17A.

Tutti i campioni analizzati presentano la stessa localizzazione della citochina IL-17A. In particolare le cellule positive sono riscontrabili sia nel derma superficiale che nel derma profondo e mai a livello dell'epidermide.

In Fig.5 sono illustrate immagini rappresentative della cute di pazienti affetti da Sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulmann (D) e GVHD (E) colorate per la citochina IL-17C.

La cute di soggetti affetti da diverse patologie e soggetti sani presenta differenze nella localizzazione delle cellule positive per questa citochina. In particolare soggetti sani presentano cellule positive per IL-17C solo nel derma profondo e i soggetti affetti da Acrodermatite Atrofizzante presentano cellule positive solo a livello dell'epidermide. I soggetti affetti da Morphea o da Fascite di Shulmann presentano cellule positive sia nell'epidermide che nel derma profondo. Infine i soggetti affetti da GVHD e da SSc presentano cellule positive sia a livello dell'epidermide che del derma superficiale.

In Fig.6 sono illustrate immagini rappresentative della cute di pazienti affetti da Sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulmann (D) e GVHD (E) colorate per la citochina IL-17E o IL-25.

Anche in questo caso la cute di pazienti affetti da patologie diverse presenta una diversa localizzazione delle cellule che producono la citochina. Soggetti affetti da SSc e Acrodermatite Atrofizzante presentano cellule positive solo nel derma profondo. La cute di soggetti affetti da GVHD presenta positività per la citochina sia a livello dell'epidermide che del derma profondo. Infine soggetti affetti da SSc localizzata, Fascite di Shulmann e soggetti sani presentano cellule positive sia a livello del derma superficiale che del derma profondo.

In Fig.7 sono illustrate immagini rappresentative della cute di pazienti affetti da Sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulmann (D) e GVHD (E) colorate per la citochina IL-17F.

Anche in quest'ultimo caso la localizzazione delle cellule positive è differente a seconda della patologia. In particolare soggetti affetti da Acrodermatite Atrofizzante o da Fascite di Shulmann presentano cellule positive solo a livello dell'epidermide. La cute di soggetti affetti da GVHD presenta cellule positive solo nel derma superficiale. Infine soggetti sani e soggetti affetti SSc (diffusa, limitata o localizzata) presentano cellule positive sia nel derma superficiale che nel derma profondo.

Nelle colorazioni per tutte le isoforme della citochina IL-17 i soggetti affetti da SSc (diffusa, limitata o localizzata) presentano sempre una reazione aspecifica a livello delle cellule della membrana basale dell'epidermide, sia che ci siano o meno cellule positive a livello dell'epidermide.

3. QUANTIFICA DELLA PRESENZA DELLE DIVERSE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Una volta determinata la presenza delle diverse isoforme della citochina IL-17 nella cute dei pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee (Sclerodermia diffusa e limitata, Morphea, acrodermatite atrofizzante, fascite di Shullman e GVHD), e una volta determinato che il numero di cellule positive poteva essere quantificato, è stato messo a punto un "journal" del programma Metamorph MetaXpress in modo da poter quantificare in modo semi-automatico il numero di cellule positive sia rispetto all'area totale analizzata che rispetto al numero di nuclei.

Tutte le immagini acquisite con il microscopio Mirax sono state esportate con gli stessi parametri e sono state analizzate con il journal messo a punto. I dati ottenuti dal journal sono stati poi ricontrollati manualmente.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software GraphPad Prism 6.0 utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. Una $p < 0,05$ è stata considerata una differenza statisticamente significativa.

In Fig.8 sono mostrati i grafici relativi alle analisi per la citochina IL-17A. E' stata calcolata la percentuale di cellule positive sia rispetto all'area totale analizzata (Fig.8A) che rispetto al numero totale di cellule (Fig.8B). Nel primo caso la percentuale media di cellule positive è di circa il 10%, mentre nel secondo caso è circa del 5%. Mettendo a confronto i soggetti sani con i gruppi patologici, non si hanno differenze significative.

A causa della ridotta quantità di materiale solo per questa citochina sono stati inclusi nell'analisi anche 7 soggetti sani provenienti da Ginevra e 8 soggetti affetti da SSc provenienti da Milano utilizzati anche per uno studio precedente.

In Fig.9 sono mostrati i risultati relativi alle analisi per la citochina IL-17C. La percentuale di cellule positive di tutti i gruppi analizzati rispetto all'area totale (Fig.9A) è di circa 3.5, mentre quella rispetto al numero totale di cellule è di circa 2.5. Confrontando i controlli sani con i gruppi patologici, anche in questo caso non si riscontrano differenze significative.

In Fig.10 sono mostrati i risultati relativi alla citochina IL-17E (o IL-25). La percentuale media di cellule positive di tutti i gruppi rispetto all'area totale analizzata è di circa il 10% (Fig.10A), mentre la percentuale di cellule positive rispetto al numero di cellule totali presenti nella sezione analizzata è di circa il 4%. Anche in questo caso non emergono differenze significative confrontando il gruppo dei controlli sani con i diversi gruppi di soggetti patologici.

Infine in Fig.11 sono rappresentati i risultati relativi alle analisi della citochina IL-17F. La percentuale media di cellule positive di tutti i gruppi analizzati rispetto all'area totale è di circa il 3,5% (Fig.11A), mentre quella rispetto al numero totale di cellule è circa del 2% (Fig.11B).

In tutte le colorazioni sia i controlli sani che i gruppi dei soggetti affetti da SSc e da morfea presentano un'elevata dispersione dei dati.

4. RICERCA DELLE CELLULE RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Con lo scopo di determinare quali fossero le cellule responsabili della produzione di IL-17A nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee, sono state fatte delle doppie colorazioni in immunofluorescenza con IL-17A e CD3 e con IL-17A e Triptasi .

Ogni colorazione è stata fatta almeno su 2 fettine per ogni soggetto e sono state acquisite almeno 6 immagini per ogni fettina con un microscopio a fluorescenza Axioplan utilizzando un obiettivo 40X. Le immagini sono state poi analizzate mediante un altro journal del programma Metamorph MetaXpress.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software GraphPad Prism 6.0 utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. Una $p < 0,05$ è stata considerata una differenza statisticamente significativa.

Data la ridotta disponibilità di materiale biotico, purtroppo non è stato possibile effettuare tutte le colorazioni su tutti i soggetti coinvolti nello studio.

Con lo scopo di verificare se le cellule che producono IL-17A sono cellule T, per prima cosa è stata fatta una doppia colorazione utilizzando un anticorpo anti-IL-17A e un anticorpo anti-CD3 (Fig.12A). Per ogni soggetto sono state colorate almeno 2 fettine e sono state acquisite almeno 6 immagini per ogni fettina con un microscopio Axioplan con un obiettivo 40X. Le immagini sono state poi analizzate utilizzando un sistema semi-automatico costituito da un journal appositamente creato con il software Metamorph/MetaXpress. I risultati ottenuti mostrano un aumentato numero di cellule Th17 (cellule positive sia per CD3 che per IL-17A) sia rispetto al numero di cellule totali (Fig.12B) che rispetto al numero di cellule T (Fig.12C) in tutti i gruppi patologici rispetto ai soggetti sani. In nessun caso, però, questo aumento è statisticamente significativo.

Paragonando il numero di cellule positive per il IL-17A con il numero di cellule Th17 (positive sia per IL-17A che per CD3) è evidente che le prime sono più numerose delle seconde (dati non mostrati).

Successivamente è stata fatta una doppia colorazione con IL-17A e Triptasi per identificare i mastociti in grado di produrre IL-17A (Fig.13A). L'analisi delle immagini acquisite mostra che il numero di mastociti che producono IL-17A è superiore nei controlli se paragonati ai gruppi di soggetti patologici (Fig.13B). In particolare il numero di cellule doppie positive è significativamente superiore nei soggetti sani rispetto ai soggetti affetti da SSc (diffusa o limitata) ($p=0.0485$). In tutti i gruppi circa il 50% dei mastociti producono IL-17A (Fig.13C). Ma non vi è una differenza significativa se i gruppi di soggetti patologici vengono paragonati con i soggetti sani.

È in corso un'analisi analoga per verificare quali siano le cellule responsabili della produzione delle altre isoforme della citochina IL-17

5. RUOLO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ILOPROST NELL'ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI SCLERODERMICI

Dati di letteratura mostrano che la somministrazione di Iloprost o di NAC sembra avere un ruolo nell'alleviare i sintomi legati alla sclerodermia.

I sei pazienti affetti da SSc reclutati dall'ospedale di Ancona sono stati trattati 3 con Iloprost e 3 con NAC e hanno subito un secondo prelievo bioptico dopo 1 anno di follow-up.

Per verificare l'eventuale influenza di questi due farmaci sull'espressione delle varie isoforme di IL-17 nella cute di questi pazienti, sono state fatte delle colorazioni di immunistochemica analoghe a quelle descritte in precedenza con gli anticorpi in grado di riconoscere le diverse isoforme della citochina.

Tutte le immagini acquisite con il microscopio Mirax sono state esportate con gli stessi parametri e sono state analizzate con il journal messo a punto. Anche in questo caso i dati ottenuti dal journal sono stati poi ricontrollati manualmente.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software GraphPad Prism 6.0 utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. Una $p < 0,05$ è stata considerata una differenza statisticamente significativa.

L'analisi delle immagini relative alla colorazione delle fettine con l'anticorpo anti-IL-17A mostra che il trattamento con NAC induce un aumento nella produzione della citochina in tutti e 3 i pazienti trattati, mentre il trattamento con Iloprost induce l'aumento di espressione in due dei soggetti trattati e la diminuzione nel terzo soggetto sia analizzando la percentuale di cellule positive rispetto all'area totale analizzata (Fig. 14Ai e ii) che rispetto al numero totale di cellule (Fig.14Bi e ii).

L'espressione di IL-17C aumenta in 2 dei soggetti trattati con NAC e diminuisce nel terzo, mentre diminuisce notevolmente in 2 dei pazienti trattati con Iloprost e aumenta leggermente nel terzo sia nell'analisi del numero di cellule positive per la citochina rispetto all'area (Fig.15Ai e ii) che rispetto al numero totale di cellule (Fig.15Bi e ii).

Le cellule in grado di produrre la citochina IL-17E diminuiscono in tutti e 3 i soggetti trattati con NAC, e in uno dei tre pazienti la diminuzione è particolarmente evidente, in entrambe le analisi (Fig.16Ai e 16Bi). I soggetti trattati con Iloprost si comportano invece in modo diverso: in un soggetto le cellule positive per IL-17E sono aumentate, in uno diminuite e nel terzo non vi sono variazioni se si analizza la percentuale di cellule positive rispetto all'area totale analizzata, mentre 2 soggetti presentano una percentuale di cellule positive aumentata e uno diminuita se si rapporta il numero di cellule positive per la citochina rispetto al numero totale di cellule (Fig.16Aii e Bii).

Per quanto riguarda l'isoforma F della citochina IL-17, i tre soggetti trattati con NAC presentano un leggero aumento nella percentuale di espressione, così come due dei soggetti trattati con Iloprost, mentre il terzo presenta una diminuzione. I risultati sono analoghi sia se si calcola la percentuale di cellule rispetto all'area totale (Fig.17Ai e ii) che rispetto al numero totale di cellule (Fig.17Bi e ii).

Successivamente abbiamo iniziato a valutare quali fossero le cellule coinvolte nella produzione delle diverse isoforme della citochina IL-17. Con questo scopo ad oggi sono state fatte delle doppie

colorazioni per verificare quali fossero le cellule responsabili della produzione di IL-17A con anticorpi in grado di colorare le cellule T (anti-CD3) o i mastociti (Triptasi). Analoghe analisi per le altre isoforme della citochina IL-17 sono ancora in corso.

La percentuale di cellule Th17 (positive sia per CD3 che per IL-17A) è aumentata in tutti e tre i soggetti trattati con NAC, mentre è aumentata in uno solo dei soggetti trattati con Iloprost e diminuita negli altri due se si rapporta il numero di cellule positive rispetto al numero totale di cellule (Fig. 18Ai e ii). Rapportando invece le cellule positive al numero di cellule T, due dei tre soggetti trattati con NAC presentano un incremento della percentuale di cellule Th17, mentre tutti e 3 i soggetti trattati con Iloprost presentano una diminuzione della percentuale di queste cellule (Fig.18Bi e ii). La percentuale di mastociti in grado di produrre IL-17A, invece, aumenta in uno dei soggetti trattati con NAC, aumenta in un altro di questi soggetti e non subisce variazioni nel terzo soggetto, aumenta in due dei soggetti trattati con Iloprost e diminuisce nel terzo calcolando la percentuale rispetto al numero di cellule totali presenti nell'area analizzata (Fig.19Ai e ii). La percentuale di cellule doppie positive rispetto al numero totale di mastociti presenti nell'area analizzata aumenta in uno dei 3 soggetti trattati con NAC, e diminuisce negli altri 2 e nei tre soggetti trattati con Iloprost (Fig.19Bi e ii).

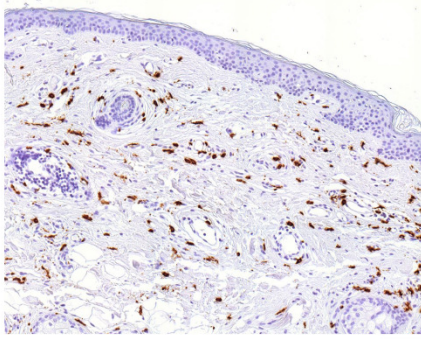
In nessun caso l'aumento o la diminuzione dell'espressione delle varie isoforme della citochina IL-17 sono significative quando si mettono a confronto il gruppo di soggetti affetti da SSc al tempo 0 con lo stesso gruppo di soggetti al tempo 1.

FIGURE

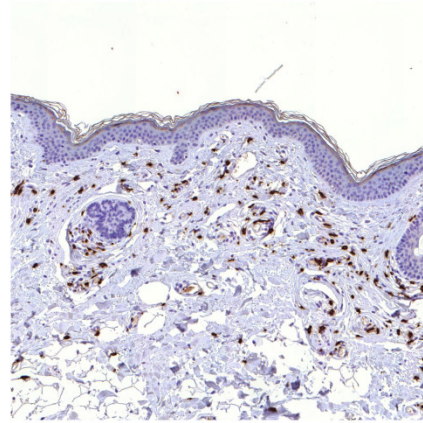
FIGURA 1. MESSA A PUNTO DELLE COLORAZIONI DI IMMUNISTOCHEMICA PER LE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17.

Localizzazione delle citochine IL-17A (A), IL-17C (B), IL-17E/IL-25 (C) e IL-17F nella cute di un controllo sano testando diversi tamponi per lo smascheramento degli antigeni, quali tampone citrato 10mM/EDTA 1mM pH 7,5; tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 8,5; tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 9; tampone EDTA 1mM pH 8; tampone EDTA (apposito per il coloratore automatico Benchmark XT, Roche/Ventana (Basel, CH), e fornito direttamente dall'azienda produttrice. Di questo tampone, purtroppo, non è quindi possibile avere le specifiche tecniche poiché è a marchio registrato). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Ingrandimento originale 20X. Le barre misurano 100µm.

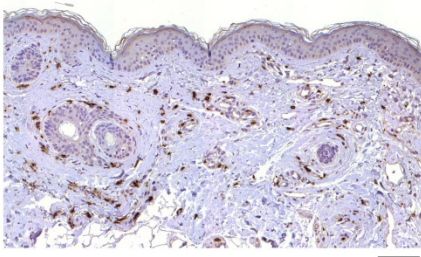
tampone citrato/EDTA pH7.5



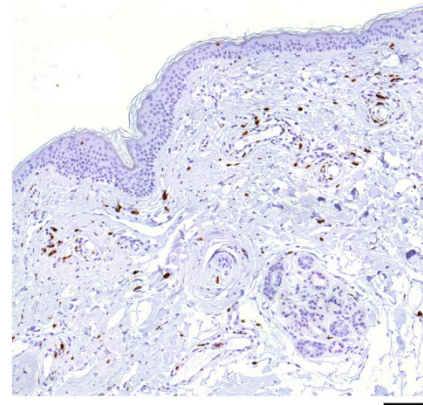
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

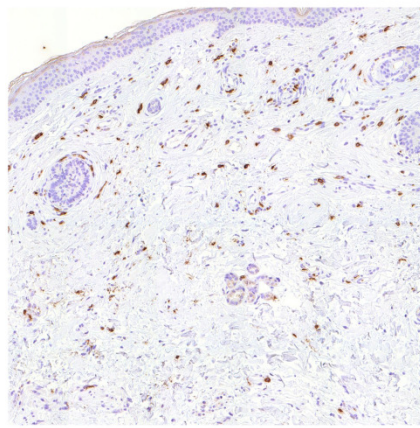
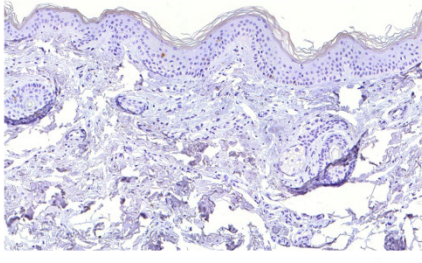
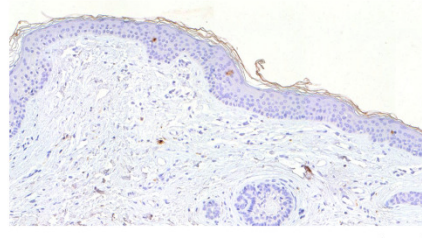


Figura 1A IL-17A

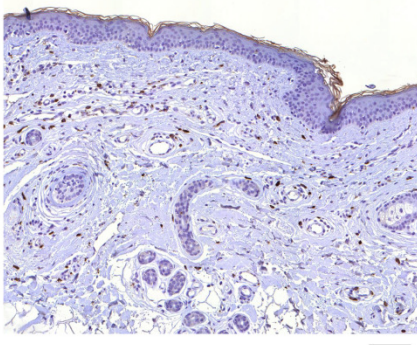
tampone citrato/EDTA pH7.5



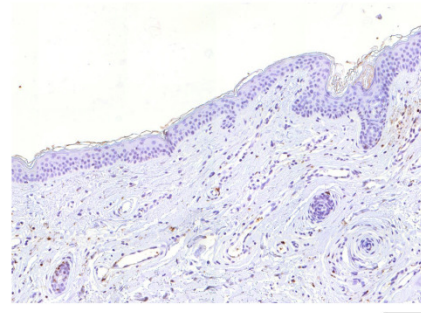
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

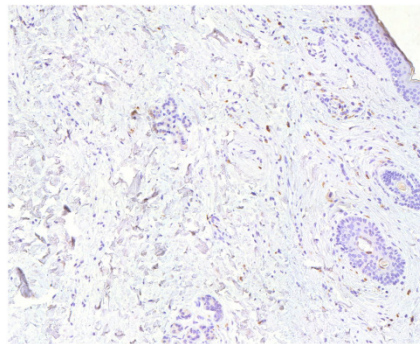
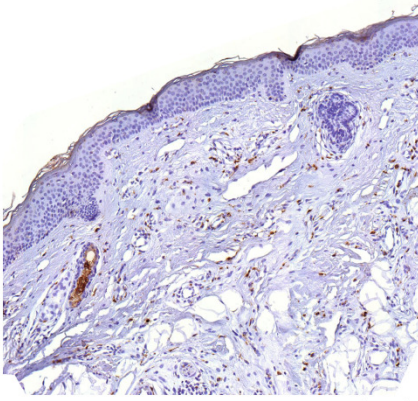
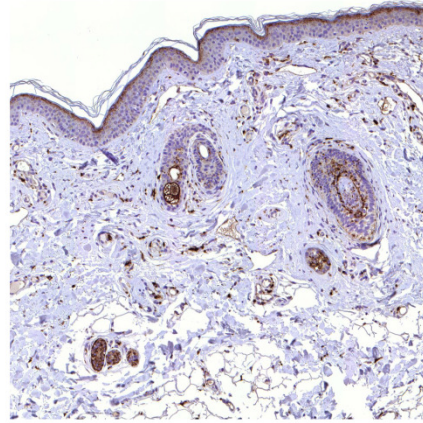


Figura 1B IL-17C

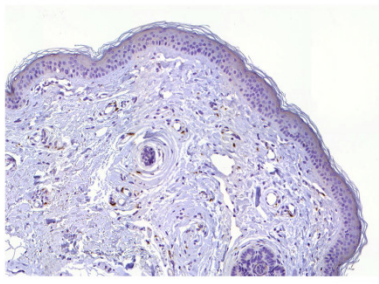
tampone citrato/EDTA pH7.5



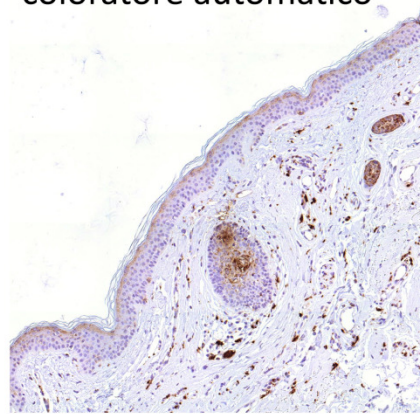
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

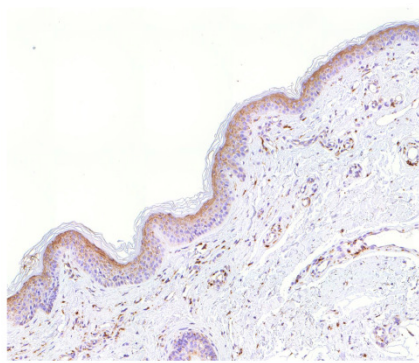
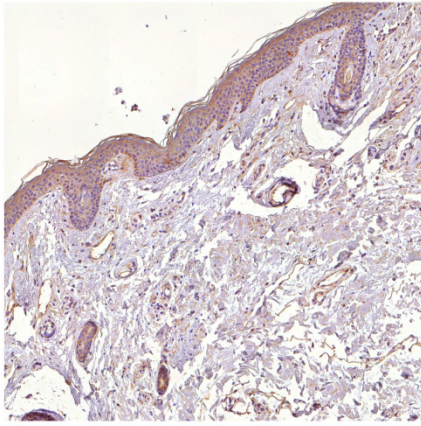
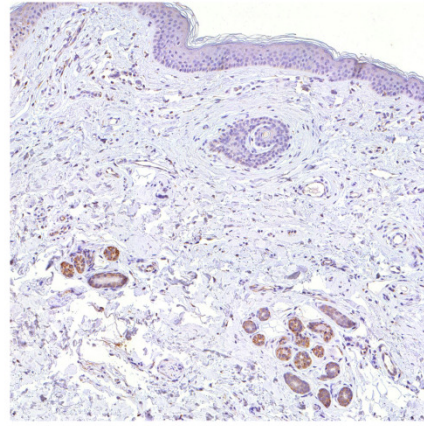


Figura 1C IL-17E/IL-25

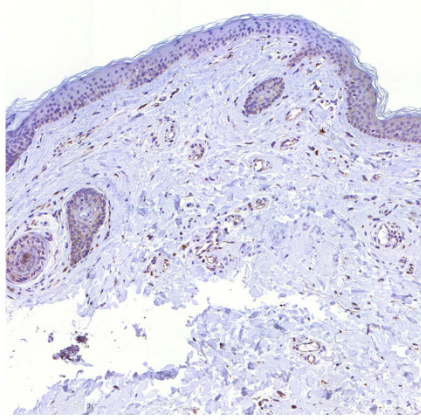
tampone citrato/EDTA pH7.5



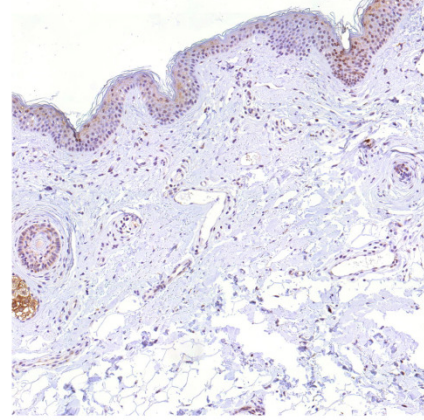
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

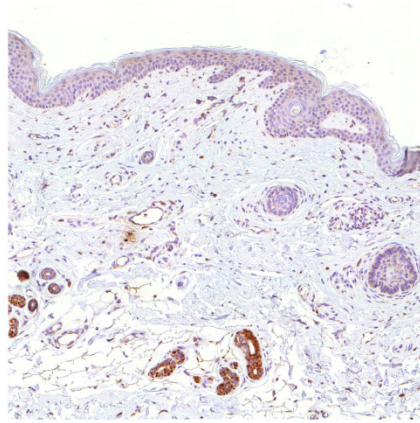
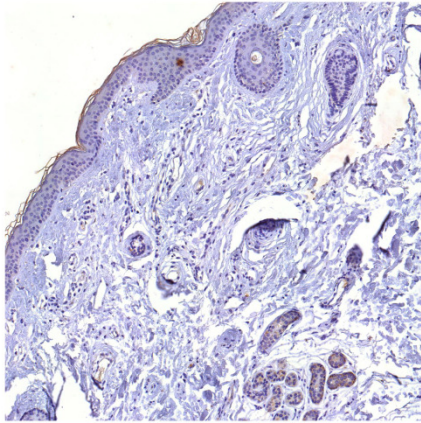


Figura 1D IL-17F

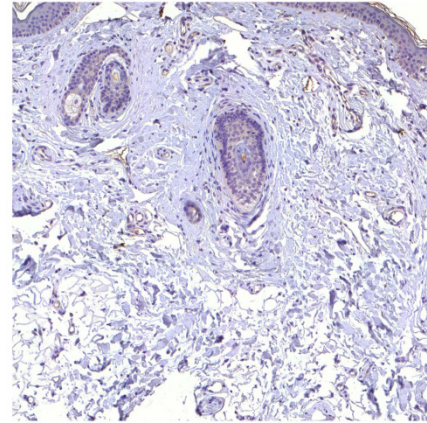
FIGURA 2. MESSA A PUNTO DELLE COLORAZIONI DI IMMUNISTOCHEMICA PER I RECETTORI DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17.

Localizzazione dei recettori IL-17R (A), IL-17RC (B) e IL-17RE (C) nella cute di un controllo sano testando diversi tamponi per lo smascheramento degli antigeni, quali tampone citrato 10mM/EDTA 1mM pH 7,5; tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 8,5; tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 9; tampone EDTA 1mM pH 8; tampone EDTA (apposito per il coloratore automatico Benchmark XT, Roche/Ventana (Basel, CH), e fornito direttamente dall'azienda produttrice. Di questo tampone, purtroppo, non è quindi possibile avere le specifiche tecniche poiché è a marchio registrato). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Ingrandimento originale 20X. Le barre misurano 100µm.

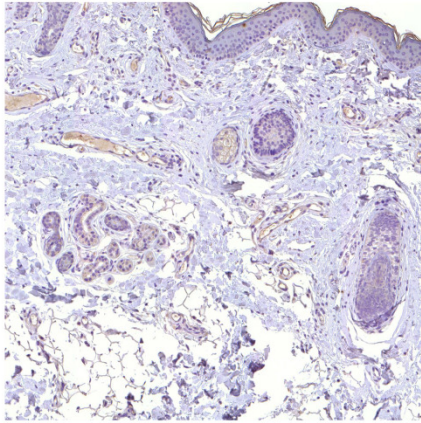
tampone citrato/EDTA pH7.5



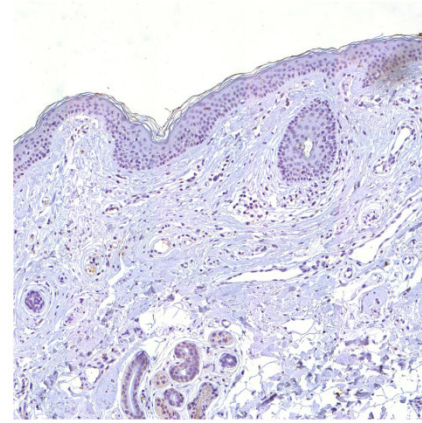
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

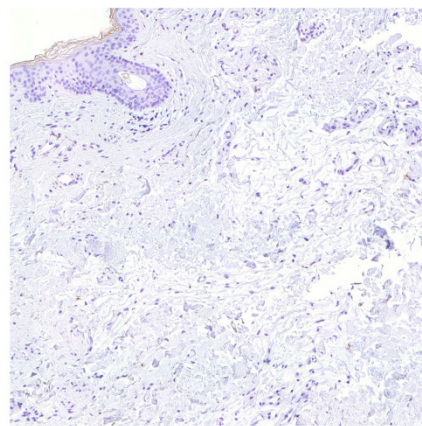
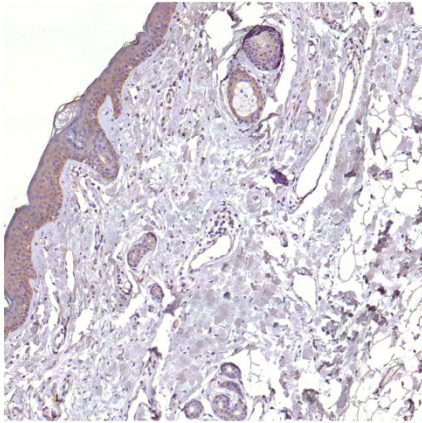
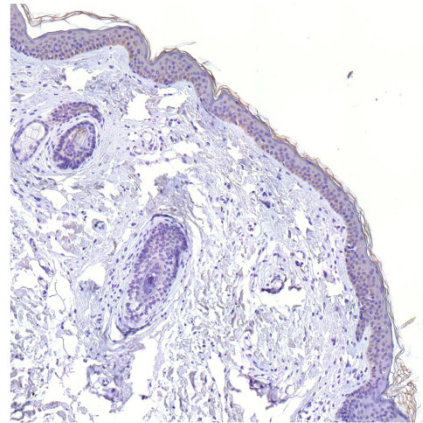


Figura 2A IL-17R

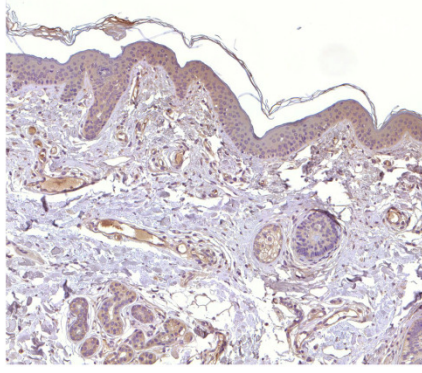
tampone citrato/EDTA pH7.5



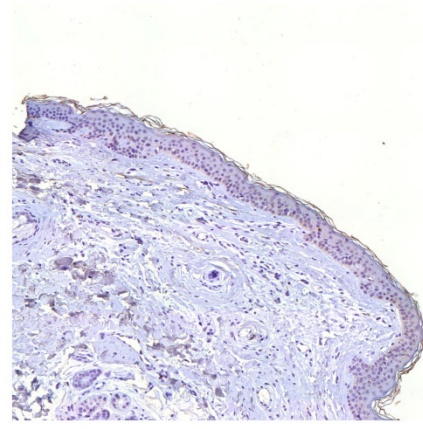
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

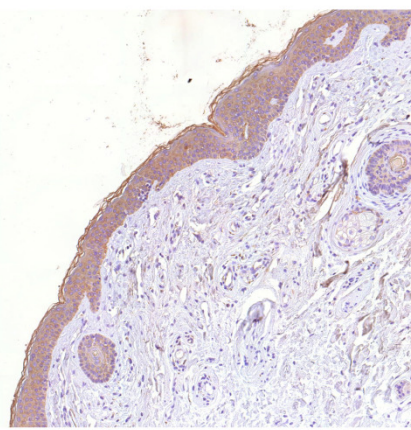
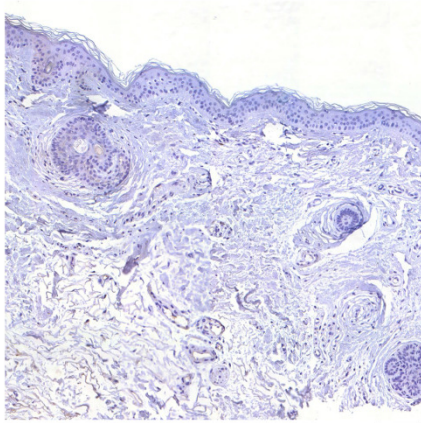
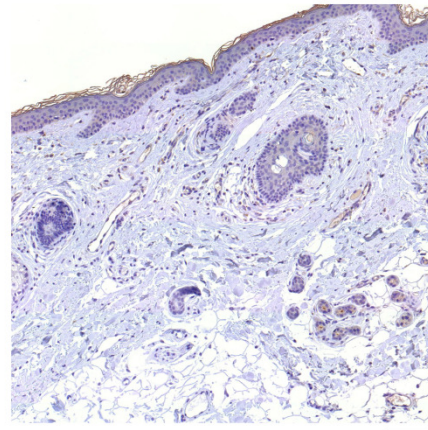


Figura 2B IL-17RC

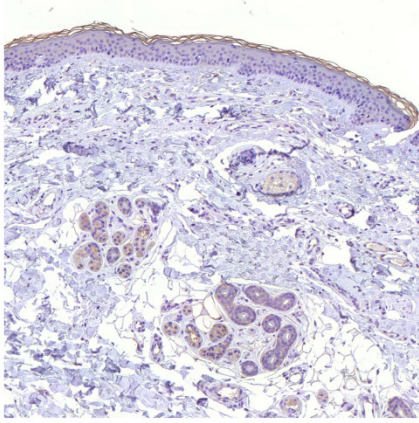
tampone citrato/EDTA pH7.5



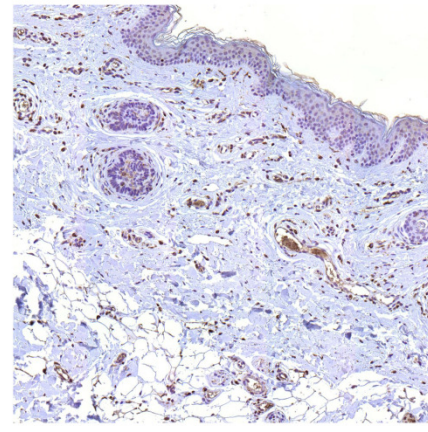
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

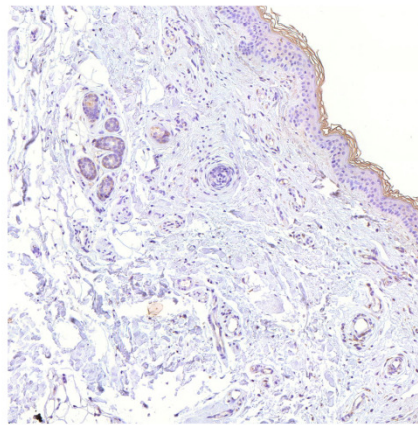
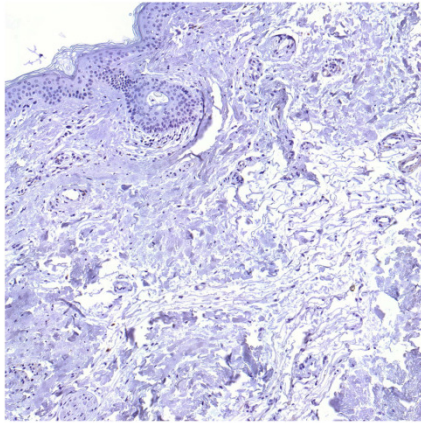


Figura 2C IL-17RE

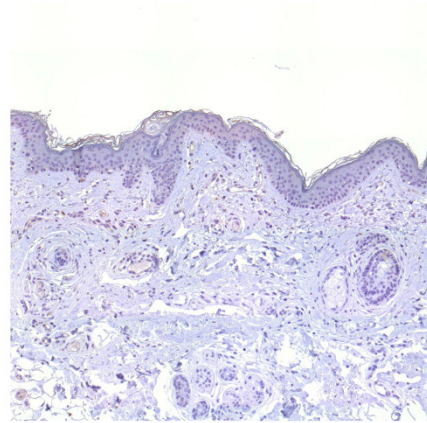
FIGURA 3. MESSA A PUNTO DELLE COLORAZIONI DI IMMUNISTOCHIMICA PER LE CITOCHINE CORRELATE ALLA CITOCHINA IL-17.

Localizzazione della citochina IL-4 (A), IL-22 (B) e INF- γ (C) nella cute di un controllo sano testando diversi tamponi per lo smascheramento degli antigeni, quali tampone citrato 10mM/EDTA 1mM pH 7,5; tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 8,5; tampone TRIS 10mM/EDTA 1mM pH 9; tampone EDTA 1mM pH 8; tampone EDTA (apposito per il coloratore automatico Benchmark XT, Roche/Ventana (Basel, CH), e fornito direttamente dall'azienda produttrice. Di questo tampone, purtroppo, non è quindi possibile avere le specifiche tecniche poiché è a marchio registrato). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Ingrandimento originale 20X. Le barre misurano 100 μ m.

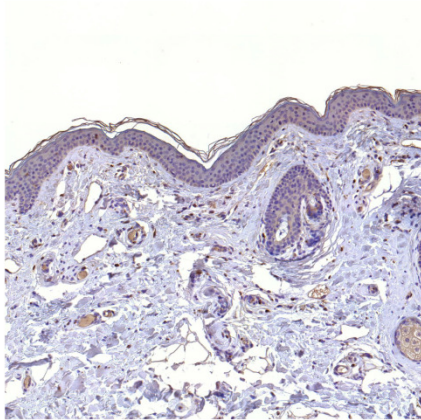
tampone citrato/EDTA pH7.5



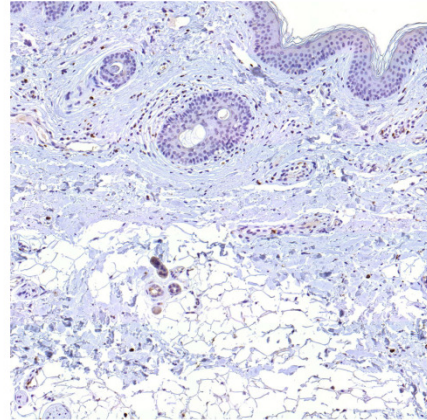
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

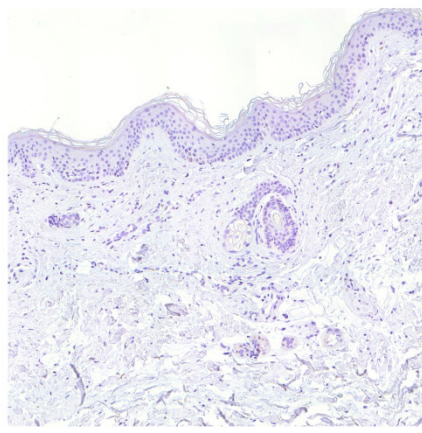
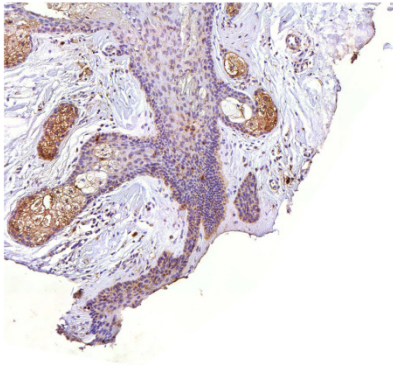
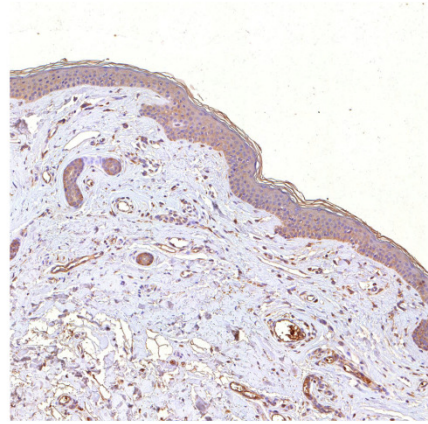


Figura 3A IL-4

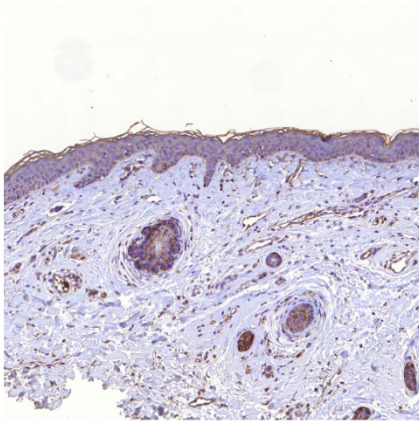
tampone citrato/EDTA pH7.5



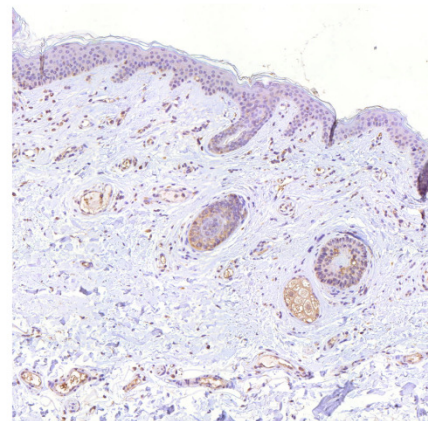
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

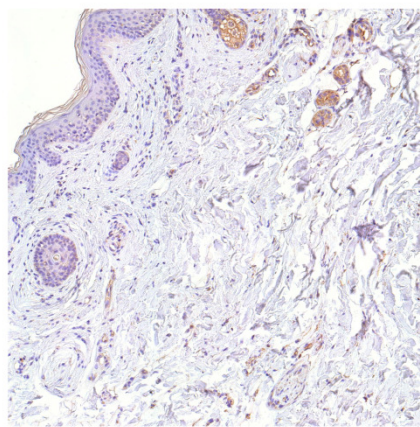
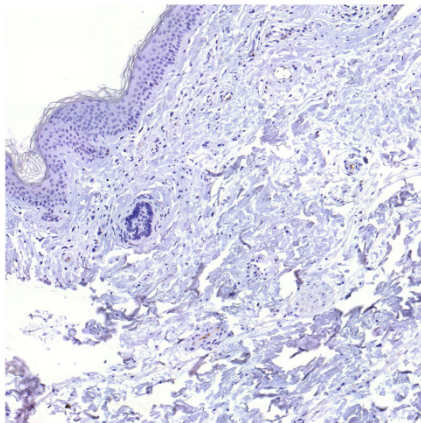
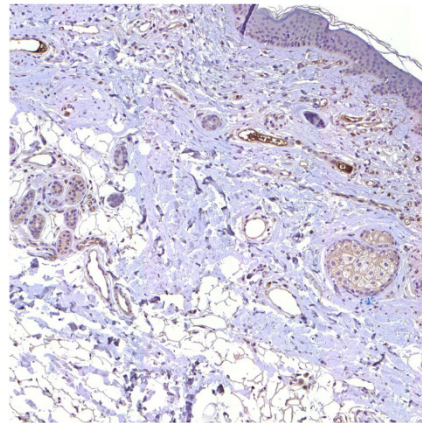


Figura 3B IL-22

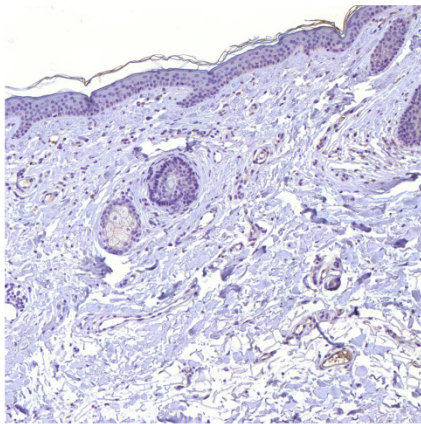
tampone citrato/EDTA pH7.5



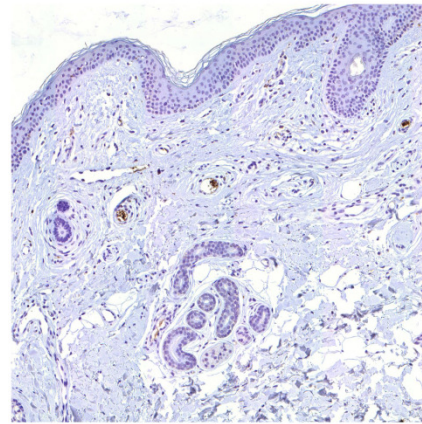
tampone TRIS/EDTA pH8.5



tampone TRIS/EDTA pH9



coloratore automatico



tampone EDTA pH8

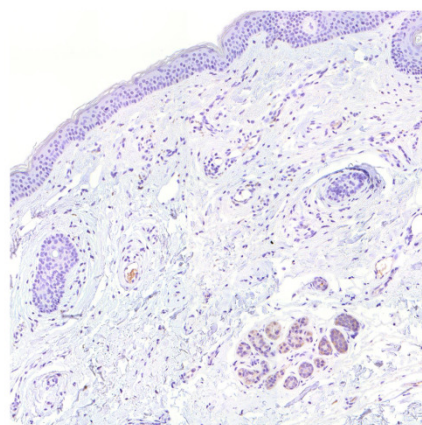
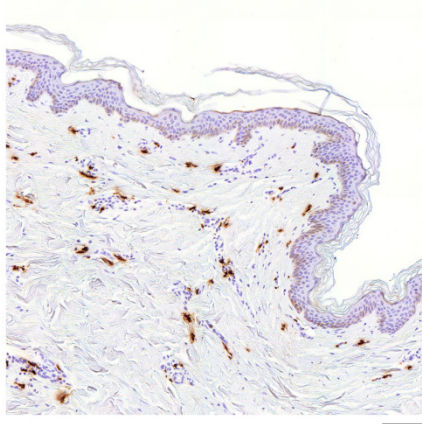


Figura 3C IFN- γ

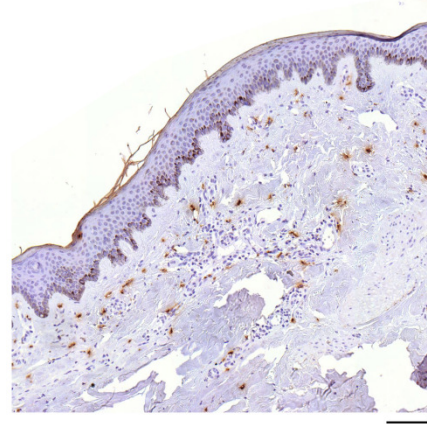
FIGURA 4. LOCALIZZAZIONE DELLA CITOCHINA IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17A nella cute di pazienti affetti da sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulman (D) e GVHD (E). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Ingrandimento originale 20X. Le barre misurano 100µm.

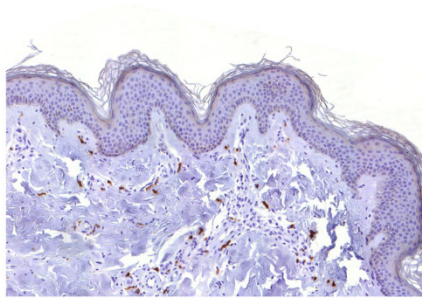
A. Scleroderma



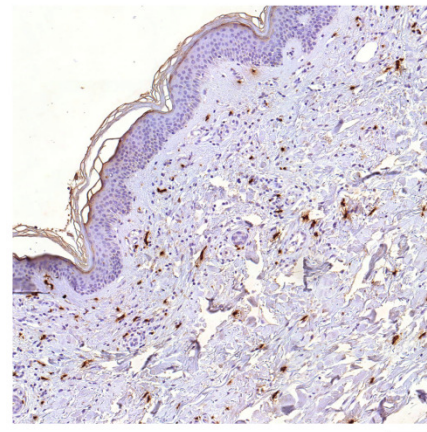
B. Morphea



C. Acrodermatite Atrofizzante



D. Fascite di Shulman



E. GVHD

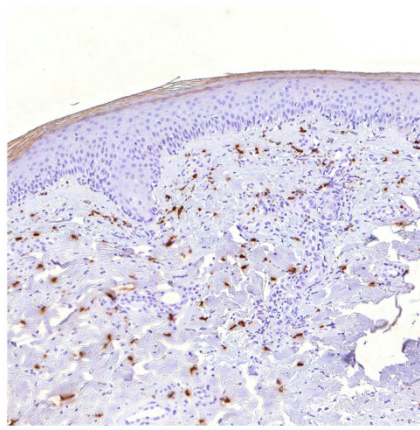
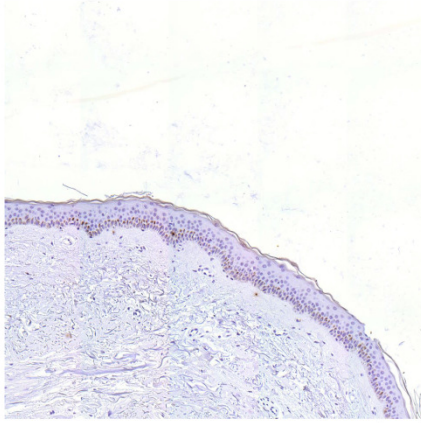


Figura 4

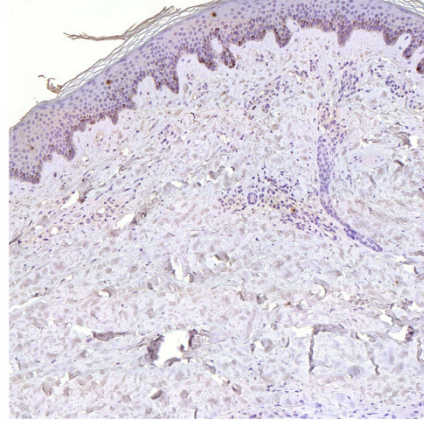
FIGURA 5. LOCALIZZAZIONE DELLA CITOCHINA IL-17C NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17C nella cute di pazienti affetti da sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulman (D) e GVHD (E). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Ingrandimento originale 20X. Le barre misurano 100µm.

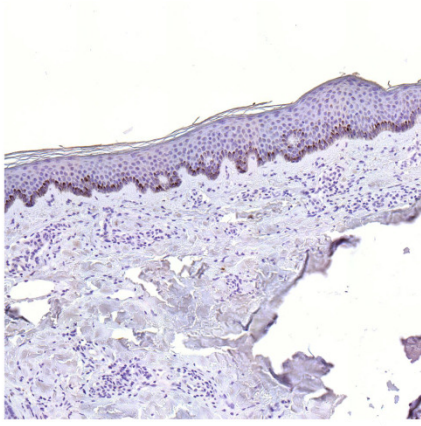
A. Scleroderma



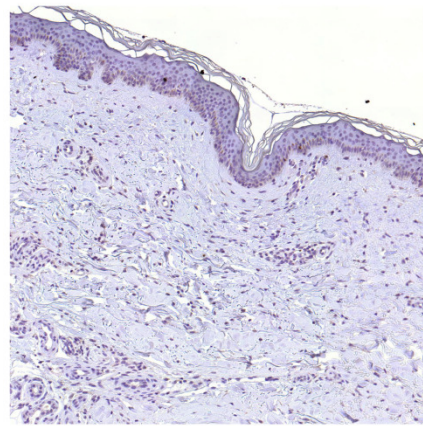
B. Morphea



C. Acrodermatite Atrofizzante



D. Fascite di Shulman



E. GVHD

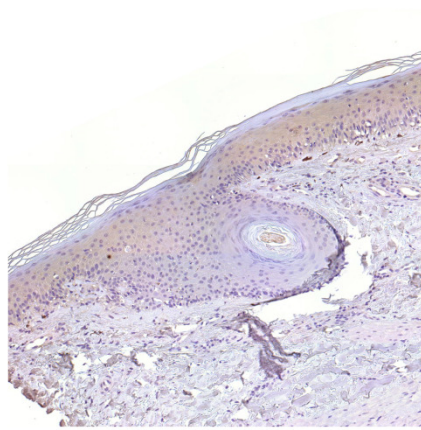
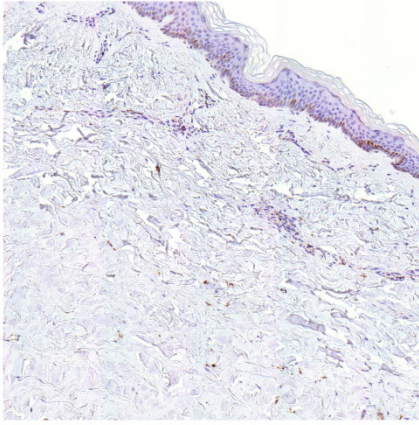


Figura 5

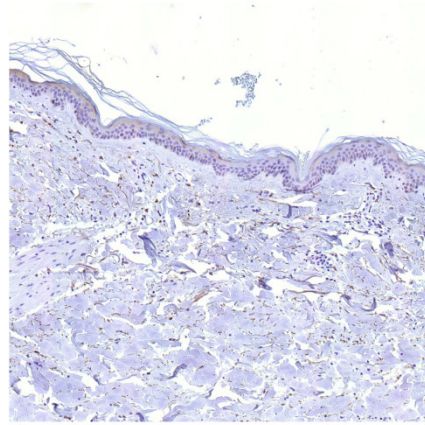
FIGURA 6. LOCALIZZAZIONE DELLA CITOCHINA IL-17E/IL-25 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17E/IL-25 nella cute di pazienti affetti da sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulman (D) e GVHD (E). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Ingrandimento originale 20X. Le barre misurano 100µm.

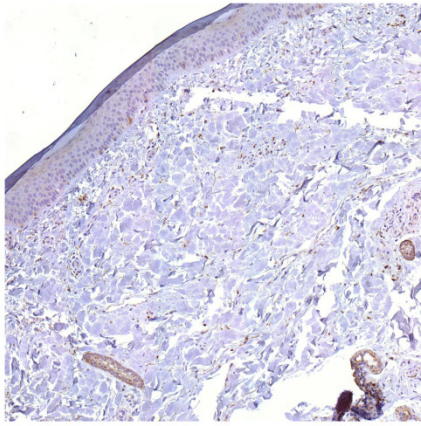
A. Scleroderma



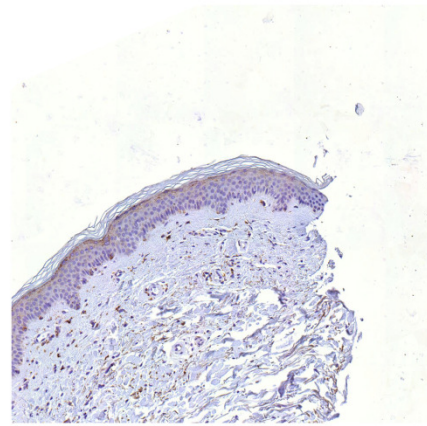
B. Morphea



C. Acrodermatite Atrofizzante



D. Fascite di Shulman



E. GVHD

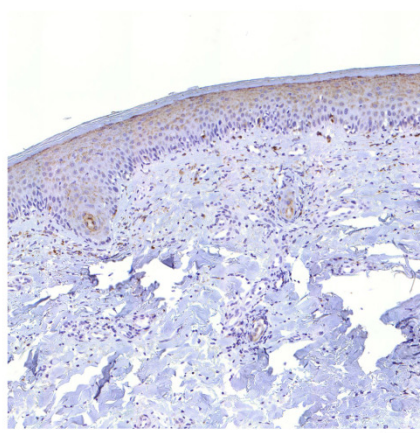
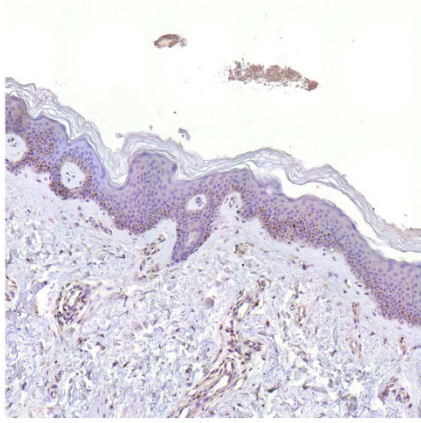


Figura 6

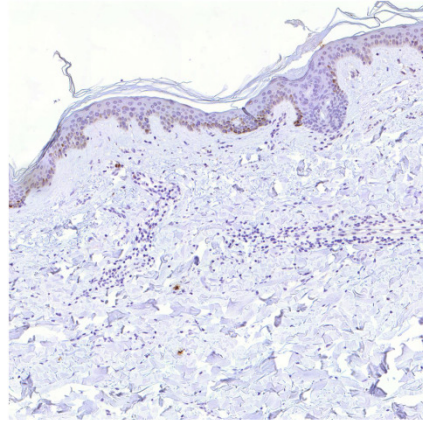
FIGURA 7. LOCALIZZAZIONE DELLA CITOCHINA IL-17F NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17F nella cute di pazienti affetti da sclerodermia (A), Morphea (B), Acrodermatite Atrofizzante (C), Fascite di Shulman (D) e GVHD (E). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Mirax-Midi ed esportate con il software Mirax-Viewer. Ingrandimento originale 20X. Le barre misurano 100µm.

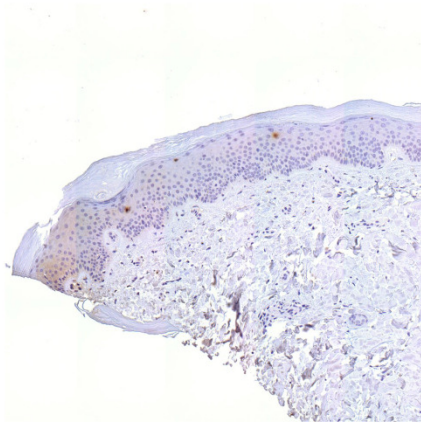
A. Scleroderma



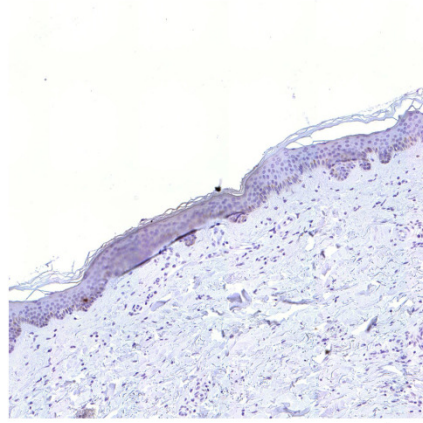
B. Morphea



C. Acrodermatite Atrofizzante



D. Fascite di Shulman



E. GVHD

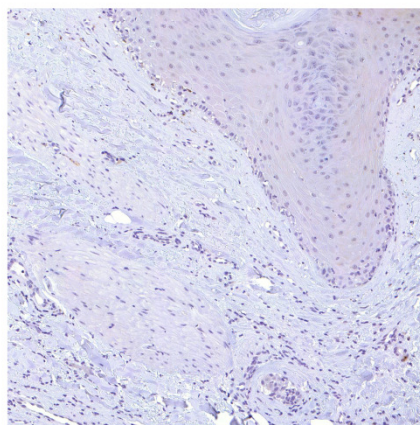
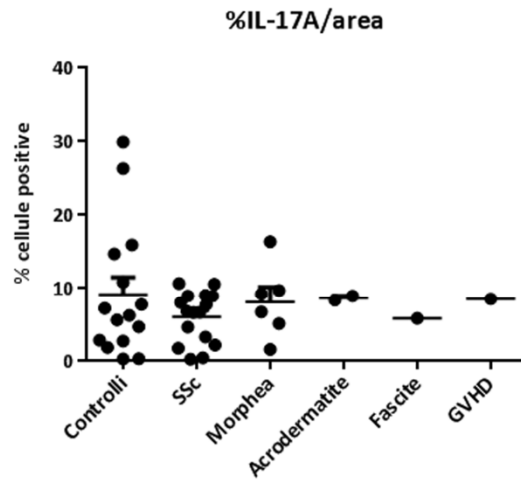


Figura 7

FIGURA 8. QUANTIFICA DELLA PRESENZA DELLA CITOCHINA IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17A nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee rispetto all'area totale analizzata (A) e rispetto al numero totale di nuclei. Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

A



B

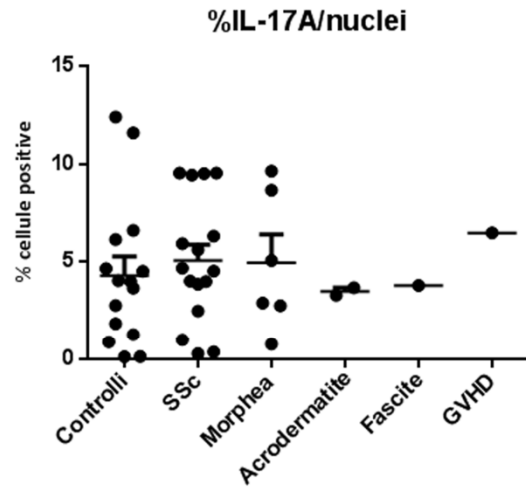


Figura 8

FIGURA 9. QUANTIFICA DELLA PRESENZA DELLA CITOCHINA IL-17C NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17C nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee rispetto all'area totale analizzata (A) e rispetto al numero totale di nuclei. Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

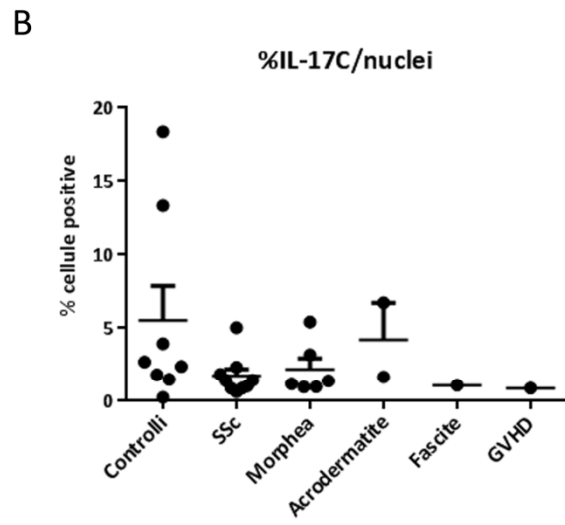
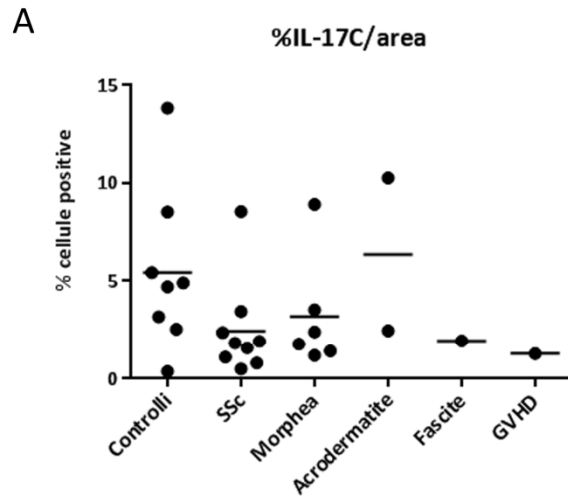
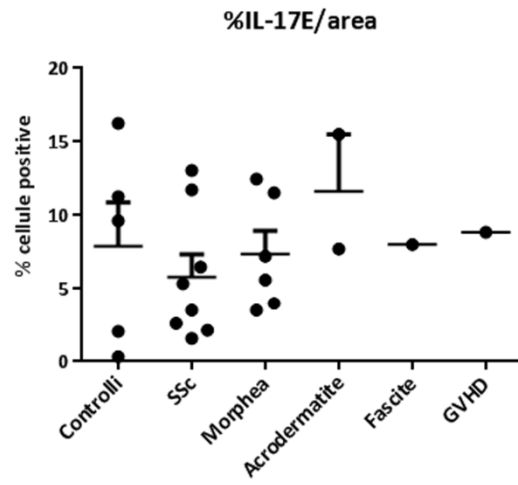


Figura 9

FIGURA 10. QUANTIFICA DELLA PRESENZA DELLA CITOCHINA IL-17E/IL-25 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17E/IL-25 nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee rispetto all'area totale analizzata (A) e rispetto al numero totale di nuclei. Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

A



B

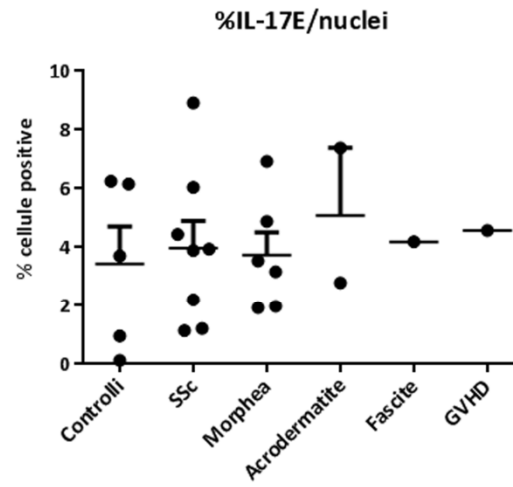


Figura 10

FIGURA 11. QUANTIFICA DELLA PRESENZA DELLA CITOCHINA IL-17F NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Localizzazione della citochina IL-17F nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee rispetto all'area totale analizzata (A) e rispetto al numero totale di nuclei. Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

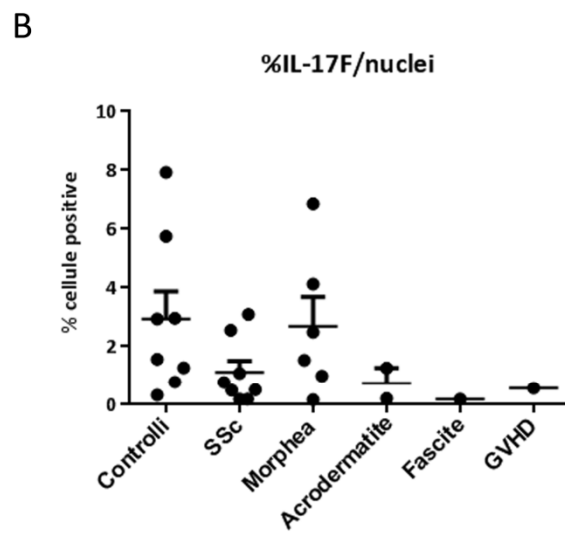
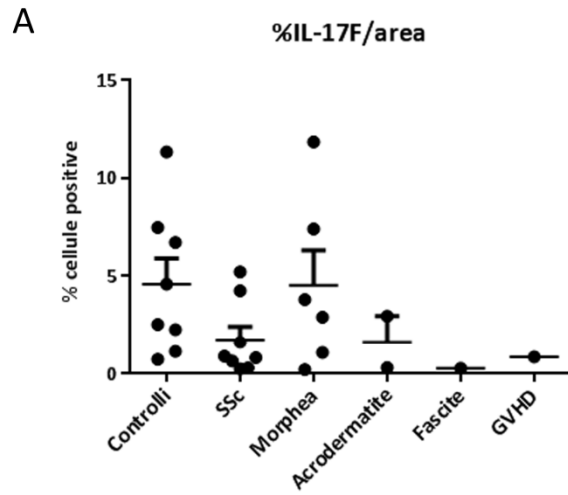
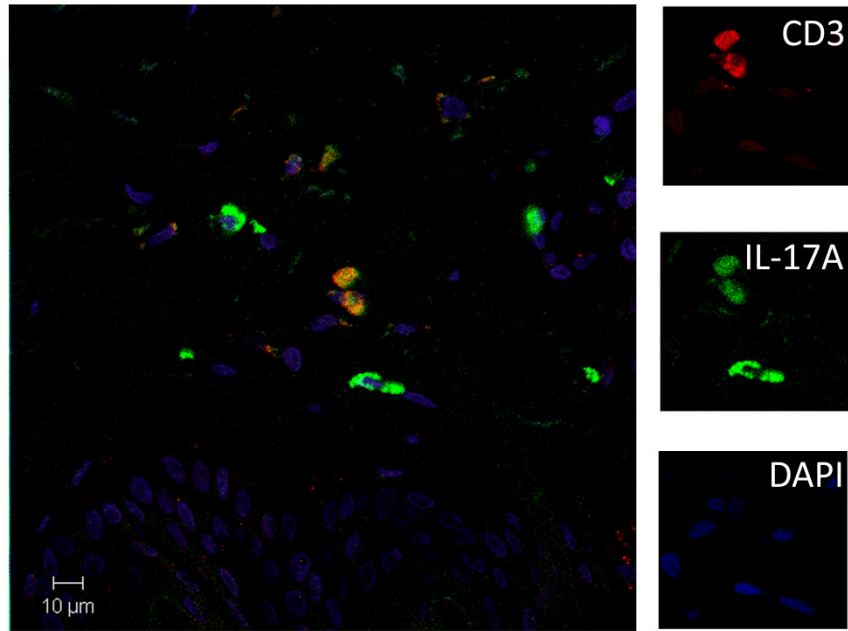


Figura 11

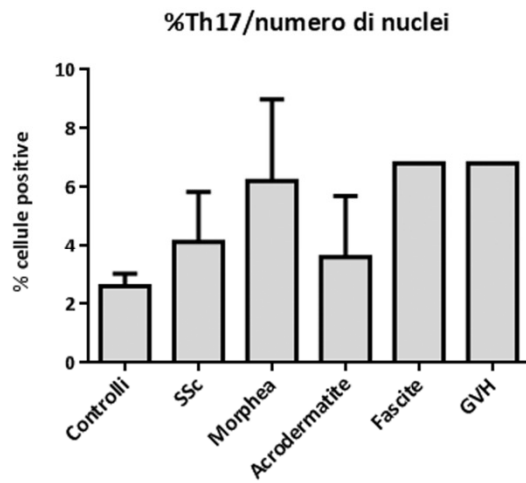
FIGURA 12. QUANTIFICA DELLE CELLULE CD3 RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Co-localizzazione per immunofluorescenza indiretta di IL-17A e CD3 nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee. Esempio di co-localizzazione (A) in un'immagine acquisita con il microscopio confocale Meta LSM 510. Ingrandimento originale 40X. La barra corrisponde a 10 μ m. Quantificazione del numero di cellule doppie positive rispetto al numero di cellule totali (B) e rispetto al numero di cellule CD3 positive (C). Le immagini acquisite con un microscopio Axioplan sono state analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

A



B



C

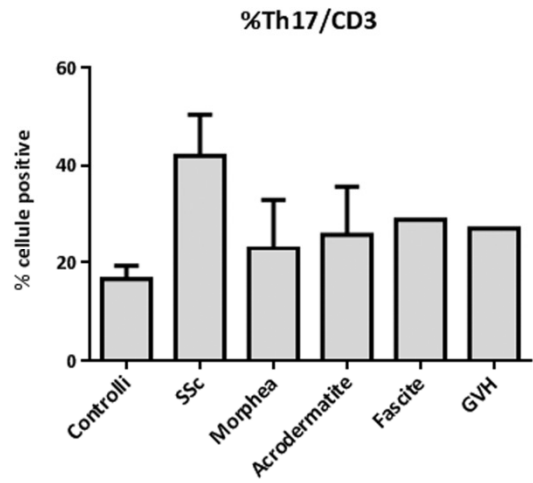
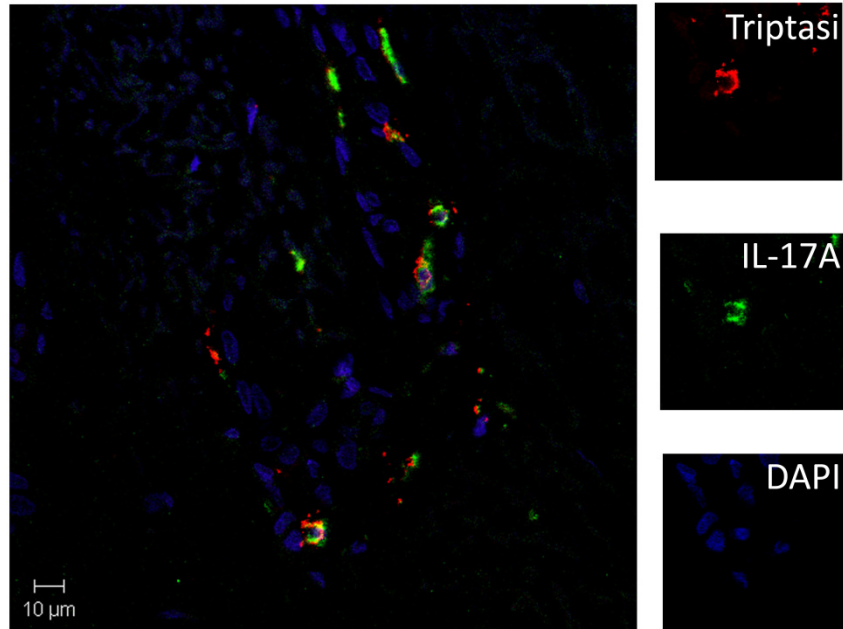


Figura 12

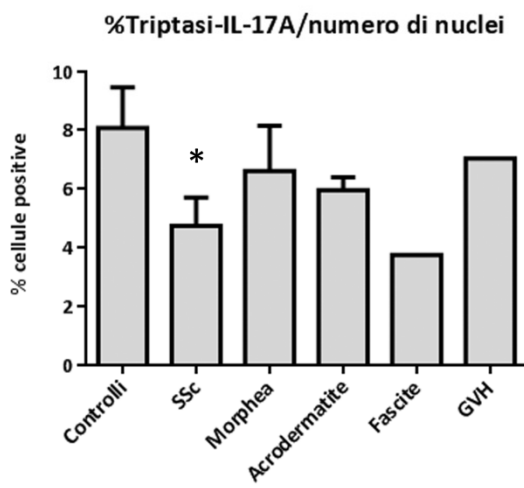
FIGURA 13. QUANTIFICA DEI MASTOCITI RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Co-localizzazione per immunofluorescenza indiretta di IL-17A e Triptasi nella cute di pazienti affetti da patologie fibrosanti cutanee. Esempio di co-localizzazione (A) in un'immagine acquisita con il microscopio confocale Meta LSM 510. Ingrandimento originale 40X. La barra corrisponde a 10 μ m. Quantificazione del numero di cellule doppie positive rispetto al numero di cellule totali (B) e rispetto al numero di mastociti (C). Le immagini acquisite con un microscopio axioplan sono state analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney. L'asterisco corrisponde a $p < 0,05$.

A



B



C

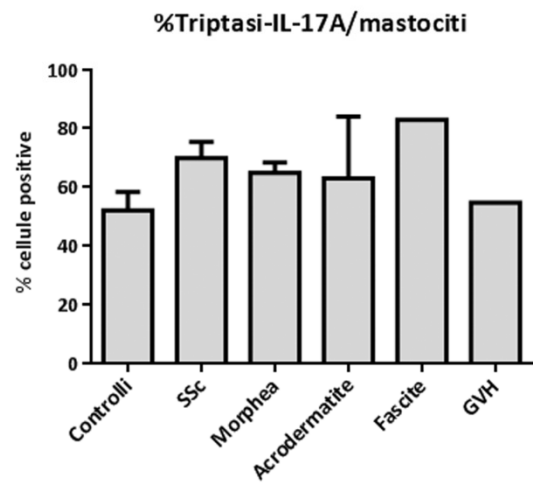


Figura 13

FIGURA 14. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI NAC O DI ILOPROST SULL'ESPRESSIONE DELLA CITOCHINA IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLERODERMIA

Quantifica dell'espressione della citochina IL-17A nella cute di pazienti affetti da Sclerodermia prima e dopo trattamento con NAC o con Iloprost rispetto all'area totale analizzata (Ai e Aii rispettivamente) e rispetto al numero totale di nuclei (Bi e Bii rispettivamente). Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

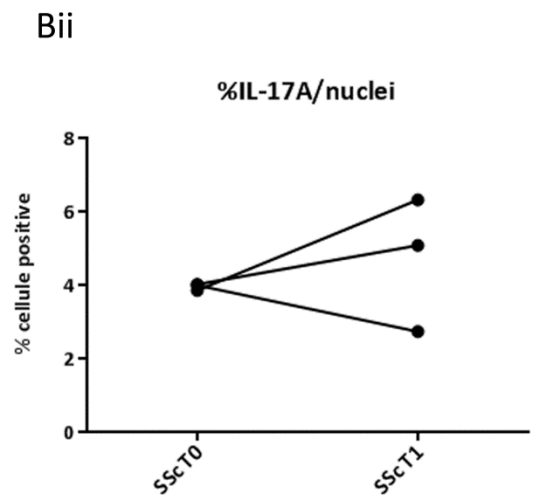
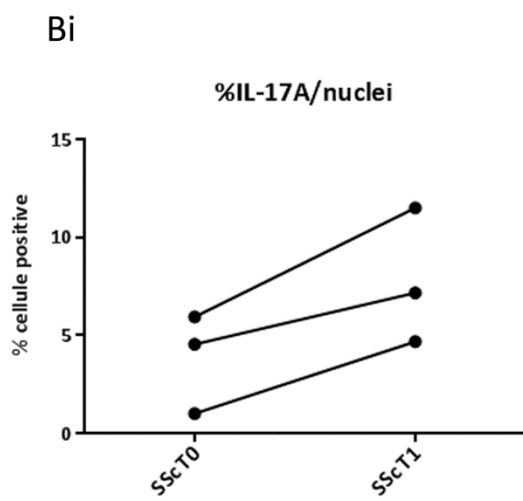
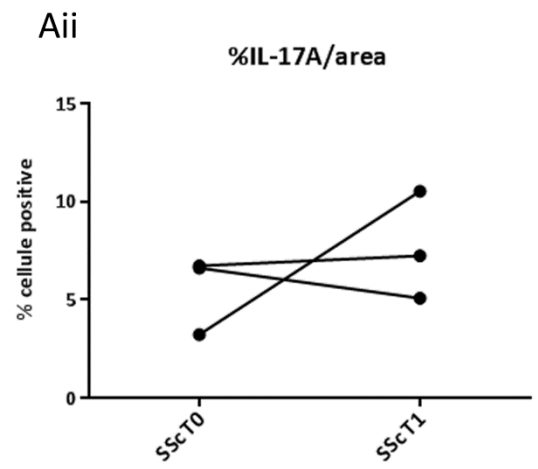
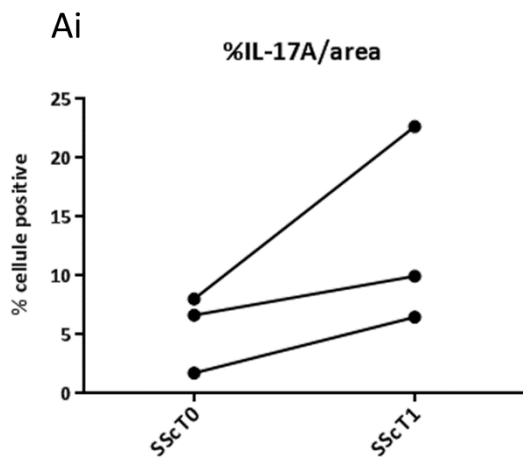


Figura 14

FIGURA 15. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI NAC O DI ILOPROST SULL'ESPRESSIONE DELLA CITOCHINA IL-17C NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLERODERMIA

Quantifica dell'espressione della citochina IL-17C nella cute di pazienti affetti da Sclerodermia prima e dopo trattamento con NAC o con Iloprost rispetto all'area totale analizzata (Ai e Aii rispettivamente) e rispetto al numero totale di nuclei (Bi e Bii rispettivamente). Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

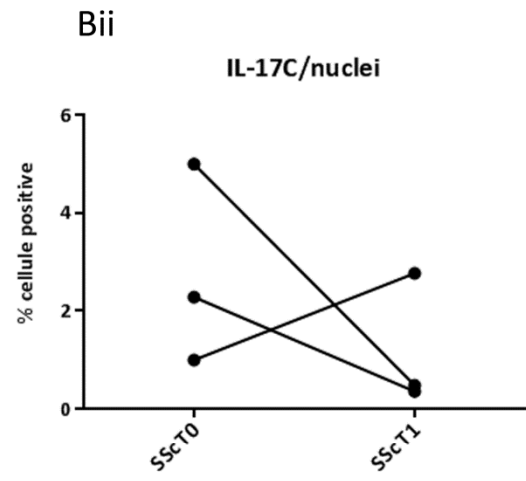
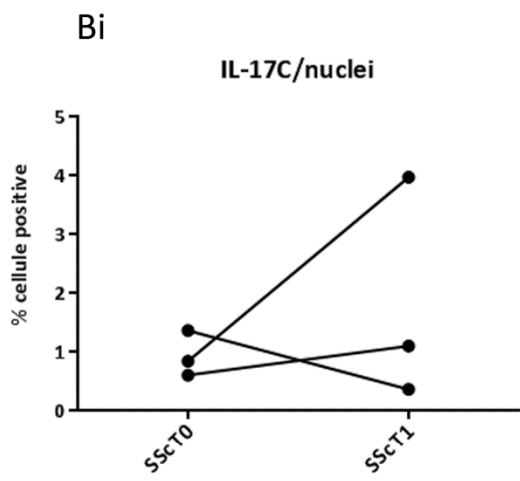
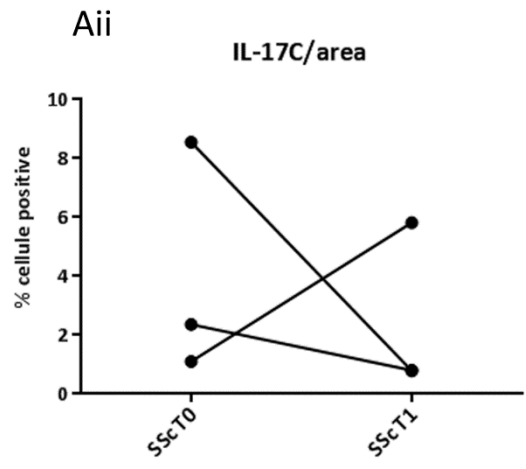
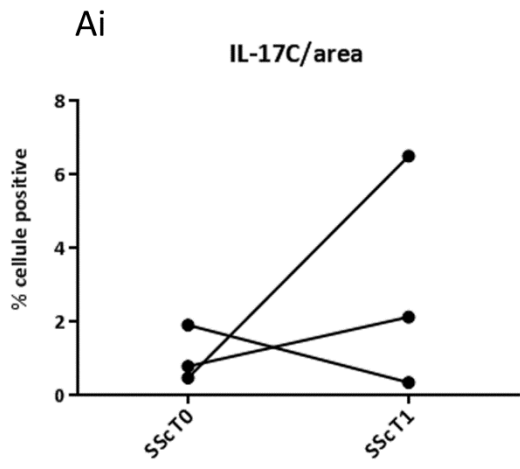


Figura 15

FIGURA 16. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI NAC O DI ILOPROST SULL'ESPRESSIONE DELLA CITOCHINA IL-17E/IL-25 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLERODERMIA

Quantifica dell'espressione della citochina IL-17E/IL-25 nella cute di pazienti affetti da Sclerodermia prima e dopo trattamento con NAC o con Iloprost rispetto all'area totale analizzata (Ai e Aii rispettivamente) e rispetto al numero totale di nuclei (Bi e Bii rispettivamente). Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

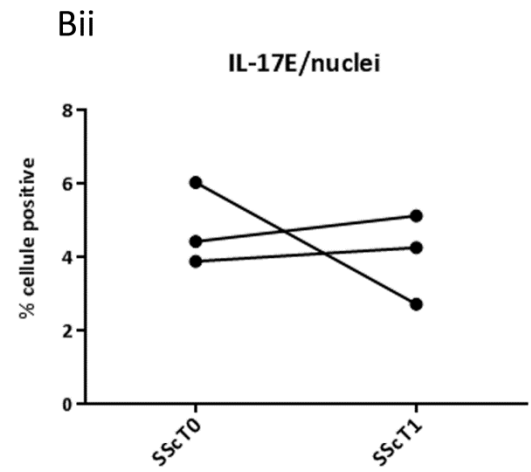
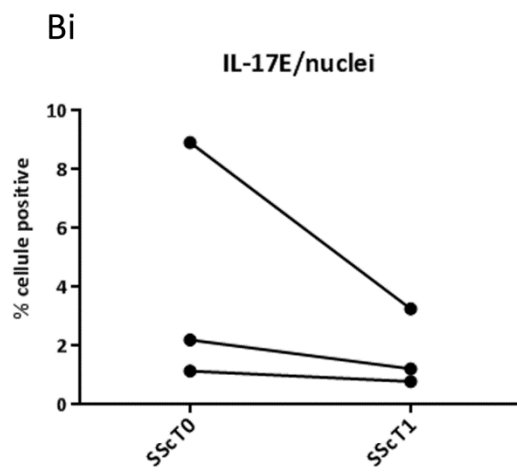
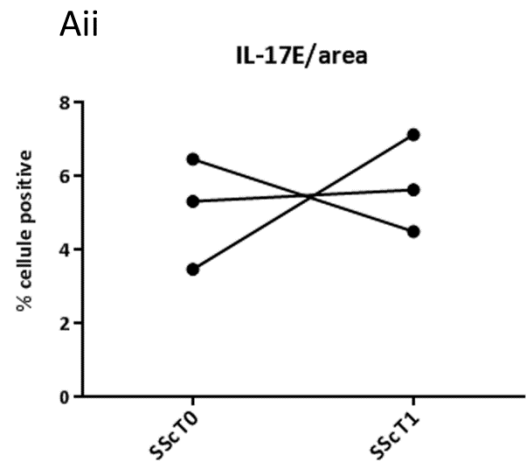
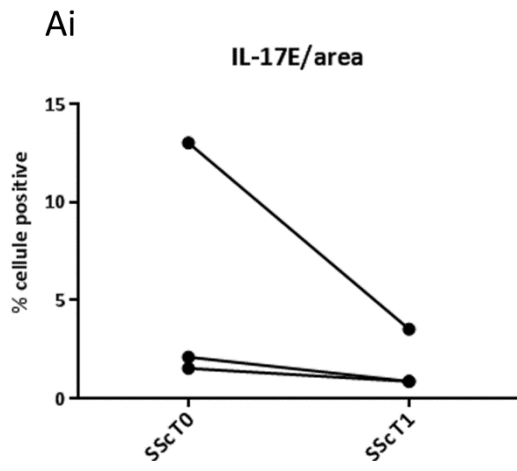


Figura 16

FIGURA 17. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI NAC O DI ILOPROST SULL'ESPRESSIONE DELLA CITOCHINA IL-17F NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLERODERMIA

Quantifica dell'espressione della citochina IL-17F nella cute di pazienti affetti da Sclerodermia prima e dopo trattamento con NAC o con Iloprost rispetto all'area totale analizzata (Ai e Aii rispettivamente) e rispetto al numero totale di nuclei (Bi e Bii rispettivamente). Le immagini acquisite con il microscopio Mirax-Midi sono state esportate con il software Mirax-Viewer e analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

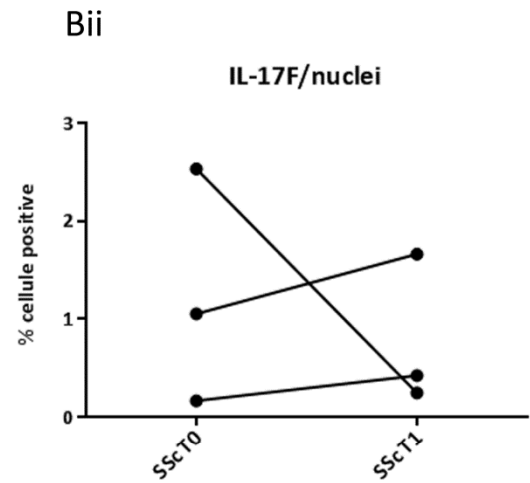
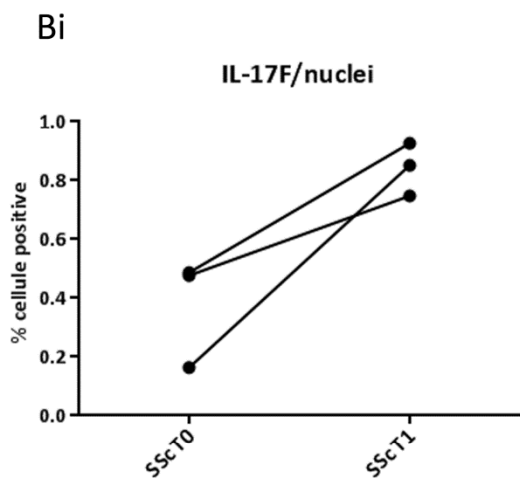
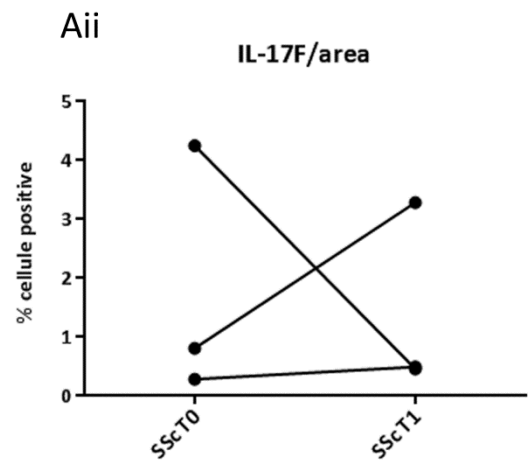
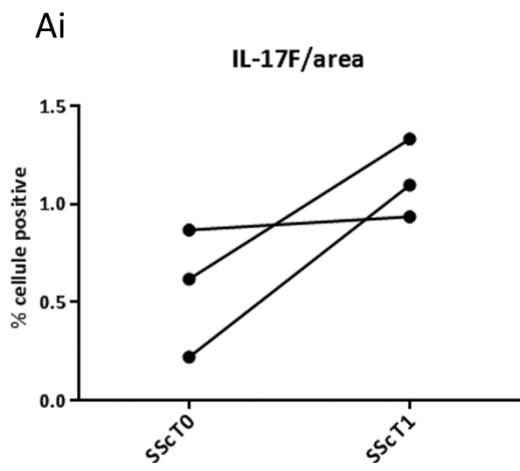


Figura 17

FIGURA 18. QUANTIFICA DELLE CELLULE CD3 RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLERODERMIA PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON NAC O ILOPROST

Quantifica dell'espressione delle cellule CD3 responsabili della produzione di IL-17A nella cute di pazienti affetti da Sclerodermia prima e dopo trattamento con NAC o con Iloprost rispetto al numero totale di nuclei (Ai e Aii rispettivamente) e rispetto al numero di cellule CD3 positive (Bi e Bii rispettivamente). Le immagini acquisite con un microscopio Axioplan sono state analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

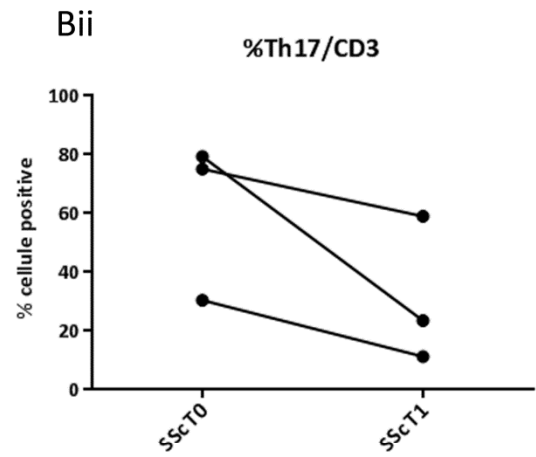
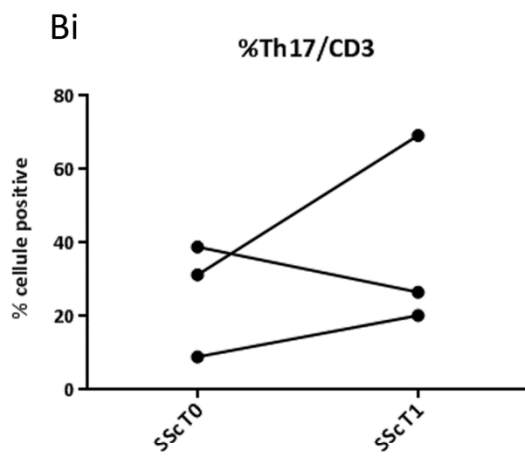
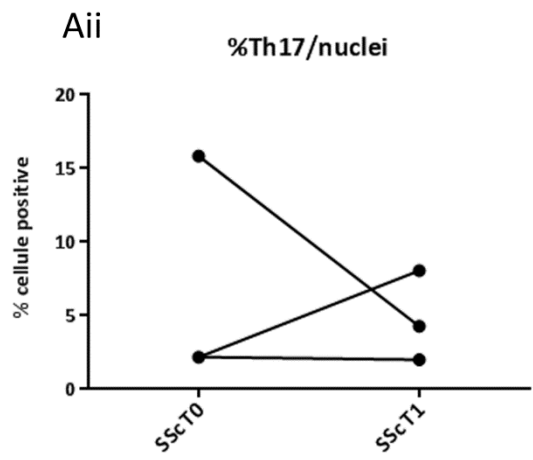
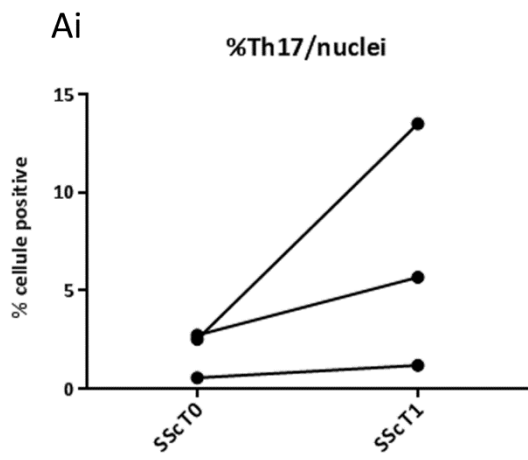


Figura 18

FIGURA 19. QUANTIFICA DEI MASTOCITI RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLERODERMIA PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON NAC O ILOPROST

Quantifica dell'espressione dei mastociti responsabili della produzione di IL-17A nella cute di pazienti affetti da Sclerodermia prima e dopo trattamento con NAC o con Iloprost rispetto al numero totale di nuclei (Ai e Aii rispettivamente) e rispetto al numero di mastociti (Bi e Bii rispettivamente). Le immagini acquisite con un microscopio Axioplan sono state analizzate con un journal del software Metamorph MetaXpress appositamente messo a punto. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I gruppi patologici sono stati messi a confronto con il gruppo dei controlli sani mediante il test statistico non parametrico di Mann-Wihtney.

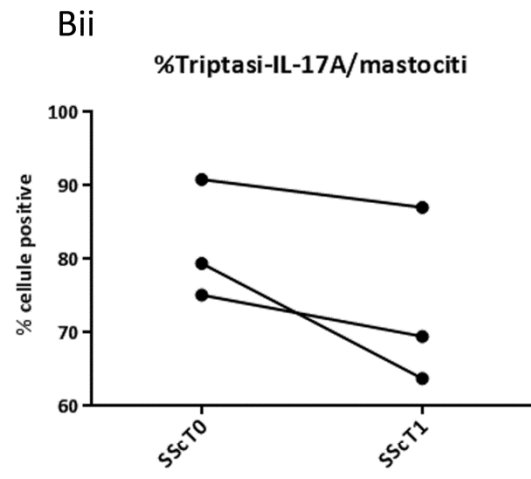
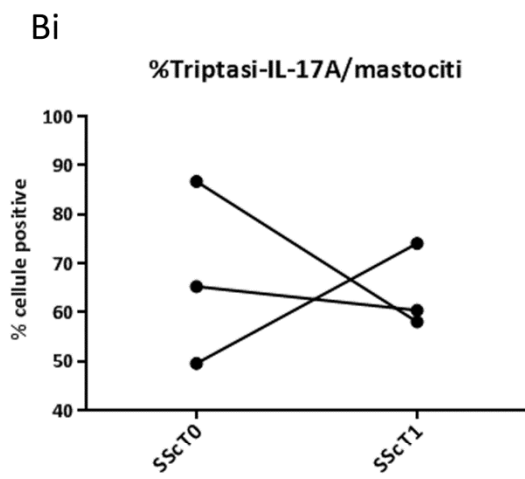
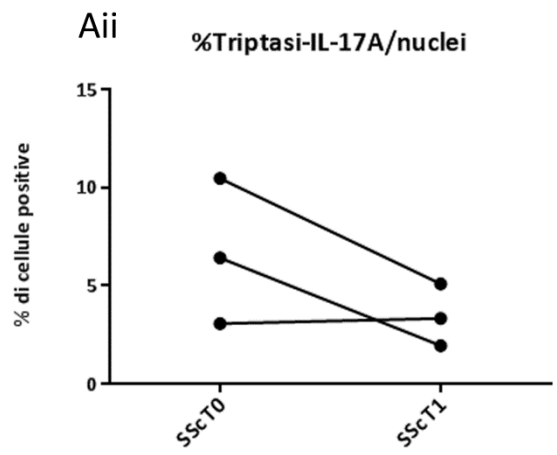
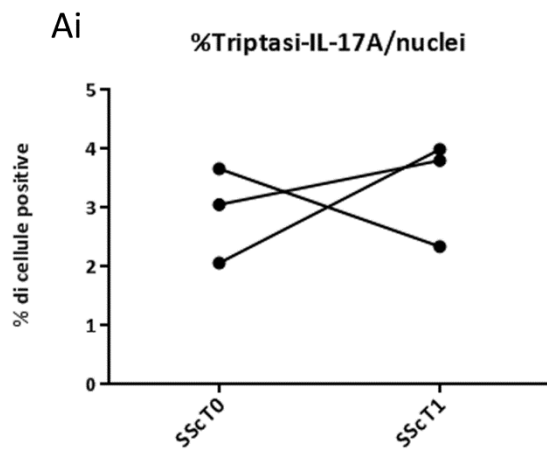


Figura 19

DISCUSSIONE

1. TECNICHE DI SMASCHERAMENTO O RECUPERO DEGLI ANTIGENI

Il processo sequenziale di fissazione, disidratazione e inclusione produce nel campione biotico importanti modificazioni che spesso influiscono negativamente sull'antigenicità delle proteine, portando al fallimento della colorazione. In passato è stato dimostrato che la fissazione con aldeidi è una delle maggiori cause di insuccesso (Berod, A. et al., 1981).

Le tecniche di smascheramento degli antigeni messe a punto negli ultimi 20 anni possono aumentare significativamente la sensibilità del rilevamento degli epitopi in immunistochemica.

Lo smascheramento degli antigeni può essere ottenuto mediante approcci fisici, chimici, o con una combinazione dei due. La scelta del metodo è generalmente antigene/anticorpo dipendente.

Nella tabella sono illustrati alcuni esempi di approcci fisici e chimici per lo smascheramento degli antigeni.

<i>Approccio chimico</i>	
digestione enzimatica	proteinasasi K, tripsina, chimotripsina, pronasi, pepsina, N-glicanasasi F, ialuronidasi
trattamenti caotropici e denaturanti	acido formico, guanidina cloridrato, guanidina tiocianato, urea, acido borico, acido acetico, sodio dodecil solfato, acido citraconico
trattamenti ossidanti (bleaching) "etching"	acido periodico, perossido di idrogeno, sodio periodato idrossido di sodio (o di potassio) in etanolo (o metanolo)
trattamenti detergenti	triton X-100
<i>Approccio fisico</i>	
trattamenti al calore	fonte di calore: microonde, autoclave, pentola a pressione, bagnetto termostato in soluzioni di: acqua distillata, saccarosio, EDTA, EGTA, TBS, cloruro di alluminio, solfato di zinco, piombo tiocianato, tampone citrato, boro
trattamenti con ultrasuoni	

In generale il principio tecnico può coinvolgere la rottura dei legami proteina-proteina introdotti dal processo di fissazione, con la conseguente esposizione dei siti antigenici agli anticorpi.

Lo smascheramento degli antigeni offre inoltre altri numerosi vantaggi. Ad esempio diminuisce la soglia di rivelazione degli antigeni, permettendo l'uso di anticorpi con una maggior diluizione, determinando un minor rischio di avere un elevato rumore di fondo e aumentando la specificità di legame. Inoltre riduce il rischio di avere falsi negativi e aumenta la riproducibilità dei risultati (D'Amico et al., 2009).

Data l'elevata eterogeneità di tecniche di smascheramento degli antigeni e dato che in letteratura non sono presenti informazioni univoche riguardo il corretto tampone da utilizzare per gli anticorpi che abbiamo deciso di utilizzare per questo studio, la prima parte di questo progetto ha previsto l'uso di parte di queste tecniche per i vari anticorpi.

Tuttavia non è stato possibile trovare il corretto tampone per tutti gli anticorpi testati. In particolare hanno dato esito negativo gli anticorpi relativi ai recettori delle isoforme della citochina IL-17, l'anticorpo anti-IL-22 e l'anticorpo anti-INF- γ (Fig.2 e Fig.3B e C).

Il dato negativo può avere due differenti spiegazioni. La prima riguarda il fatto che non è stato possibile testare tutte le tecniche di smascheramento degli antigeni a causa della ridotta quantità di tempo a disposizione. Infatti questo lavoro è stato svolto durante un periodo di collaborazione tra il laboratorio sperimentale di ricerca immunologica diretto dal Prof. Meroni presso l'Istituto Auxologico Italiano e il laboratorio di Immunologia e Allergologia diretto dal Prof. Chizzolini presso l'Ospedale Universitario di Ginevra (CH) per un periodo di 8 mesi.

La seconda riguarda invece il fatto che non esistono dati di letteratura riguardo l'espressione di queste citochine e di questi recettori da parte di cellule localizzate nella cute. Questo può significare che i risultati negativi che abbiamo ottenuto siano dovuti all'assenza di recettori e citochine in questione nei campioni analizzati.

Invece gli anticorpi relativi alle diverse isoforme della citochina IL-17 e l'anticorpo anti-IL-4 hanno dato tutti esito positivo, anche se con l'utilizzo di tamponi di smascheramento dell'antigene differenti (Fig.1 e Fig.3A).

2. LOCALIZZAZIONE E QUANTIFICA DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17 NELLA CUTE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Dati di letteratura mostrano la presenza di aumentati livelli di cellule Th17 nel sangue periferico di pazienti affetti da SSc, e aumentati livelli di IL-17A sono stati riscontrati nel siero di soggetti affetti da SSc. Inoltre è stata riscontrata la presenza di mRNA di IL-17A nella cute e nei polmoni coinvolti nella patologia. È stata inoltre riscontrata recentemente la presenza di cellule IL-17A positive nella cute di pazienti affetti da SSc (Truchetet ME et al., 2011; Truchetet ME., 2012, accepted).

A partire da queste informazioni, siamo andati ad indagare se anche le altre isoforme della citochina IL-17 fossero espresse nella cute di pazienti sclerodermici. In aggiunta, sapendo che altre patologie come la Morphea, l'Acrodermatite Atrofizzante, la Fascite di Shulman e la GVHD hanno una componente di interessamento cutaneo con caratteristiche analoghe a quelle della Sclerodermia, abbiamo esteso l'analisi di queste citochine anche alla cute lesa di pazienti affette da queste patologie.

I risultati degli esperimenti condotti indicano che tutte le isoforme sono espresse nella cute di tutti i pazienti, anche se non nelle stesse regioni.

Possiamo infatti dividere la cute in tre comparti principali, l'epidermide, il derma superficiale e il derma profondo.

L'epidermide è un epitelio di rivestimento pavimentoso composto cheratinizzato. Consiste di vari strati, ciascuno formato da uno o più piani di cellule, che procedendo dal derma verso la superficie sono: lo strato basale, quello spinoso, quello granuloso e quello corneo.

Sotto l'epidermide si trova il derma, un connettivo fibroso denso. La porzione più superficiale di questo tessuto è denominata *derma papillare*, quella più profonda e più abbondante è denominata *derma reticolare*. Nel derma papillare i fasci di fibre sono fini e a maglie strette, in quello reticolare i fasci sono grossolani e a maglie relativamente larghe.

Le diverse isoforme della citochina IL-17 sono espresse in diverse regioni della cute a seconda della patologia cutanea studiata.

In particolare le cellule positive per IL-17A sono localizzate sia nel derma superficiale che nel derma profondo in tutte e 5 le patologie (Fig.4).

Le cellule positive per IL-17C, invece, sono presenti nell'epidermide di tutti i differenti casi patologici. L'espressione di questa citochina, però, non è confinata solo all'epidermide, infatti soggetti affetti da SSc e da GVHD presentano cellule positive per IL-17C anche nel derma superficiale, mentre soggetti affetti da Sclerodermia Localizzata e da Fascite di Shulman mostrano positività per la citochina anche nel derma profondo oltre che nell'epidermide (Fig.5).

Anche la citochina IL-17E/IL-25 presenta una differente localizzazione nella cute dei soggetti esaminati. In tutte le patologie fibrosanti cutanee prese in esame il derma profondo presenta cellule positive per questa citochina. Inoltre pazienti affetti da Morphea o da Fascite di Shulman presentano cellule positive anche nel derma superficiale, a differenza del soggetto affetto da GVHD, che presenta cellule IL-17E positive anche nell'epidermide (Fig.6).

La citochina IL-17F, infine, è quella che presenta la distribuzione più variabile. Infatti non è espressa in un compartimento della cute comune a tutte le patologie analizzate. Cellule positive per la citochina sono presenti infatti nel derma superficiale e profondo di soggetti affetti da SSc e Sclerodermia Localizzata, nell'epidermide di pazienti con Acrodermatite Atrofizzante e Fascite di Shulman e nel derma superficiale del soggetto affetto da GVHD (Fig.7).

Analizzando i dati da una differente prospettiva, cioè dal punto di vista della patologia e non della citochina analizzata, anche in questo caso si ha un'elevata eterogeneità dei risultati. Infatti in tutte le patologie vi è l'interessamento di tutte e 3 le regioni delle cute analizzate, almeno da una citochina.

Queste informazioni possono portare ad una prima conclusione, cioè che patologie differenti ma con caratteristiche cutanee analoghe esprimono tutte le isoforme della citochina IL-17, anche se in regioni diverse della cute. Questo perché probabilmente le cellule che esprimono le diverse isoforme della citochina non sono le stesse, oppure perché a seconda della patologia analizzata queste cellule si trovano in regioni diverse della cute.

Successivamente le cellule positive per le diverse citochine sono state quantificate utilizzando un sistema semi-automatico e per ogni isoforma della citochina IL-17 le cellule positive presenti nei soggetti affetti dalle diverse patologie sono state messe a confronto con le cellule positive presenti nei controlli sani utilizzando il test statistico non parametrico di Mann-Whitney. In nessun caso i gruppi patologici presentano livelli di espressione delle diverse isoforme significativamente diversi rispetto ai controlli sani (Figg.8-11).

3. IDENTIFICAZIONE DELLE CELLULE RESPONSABILI DELLA PRODUZIONE DI IL-17A NELLE DIVERSE PATOLOGIE FIBROSANTI CUTANEE

Dati di letteratura indicano che diversi sono i tipi cellulari che producono IL-17A nella cute, tra cui le cellule T Th17 e i mastociti. (Navi D et al., 2007).

La doppia colorazione IL-17A e CD3 effettuata sui pazienti affetti dalle patologie fibrosanti cutanee prese in esame in questo studio mostra che il numero di cellule positive è aumentato nei gruppi patologici se confrontato con i controlli sani. Questa differenza non risulta però essere statisticamente significativa (Fig.12). Inoltre, confrontando il numero di cellule IL-17A con le cellule Th17 (positive sia per IL-17A che per CD3) è evidente che le prime sono presenti in numero maggiore rispetto alle seconde.

Questo significa che altri tipi cellulari presenti nella cute sono responsabili della produzione di IL-17A.

Per verificare se anche i mastociti fossero responsabili della produzione di IL-17A, è stata fatta una doppia colorazione per IL-17A e Tryptasi (marcatore dei mastociti) (Fig.13). I risultati ottenuti indicano che i controlli presentano un numero di cellule doppie positive maggiore rispetto a tutti i gruppi patologici, e nello specifico questa differenza risulta essere significativa confrontando i controlli sani con i soggetti affetti da SSc.

Questo suggerisce che sia mastociti che cellule Th17 sono responsabili della produzione di IL-17A, ma, oltre ad esse e alle cellule Th17, vi sono altri tipi cellulari deputati a svolgere questo compito.

Il completamento di questo lavoro prevede, oltre all'analisi di cellule doppie positive anche per le altre isoforme della citochina IL-17 (IL-17/CD3 e IL-17/Tryptasi), anche la ricerca di altre possibili cellule responsabili della produzione di queste citochine nella cute dei pazienti reclutati nello studio.

4. RUOLO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ILOPROST NELL'ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DELLA CITOCHINA IL-17A NELLA CUTE DI PAZIENTI SCLERODERMICI

Recenti dati di letteratura mostrano che analoghi di PGI₂ aumentano, in vitro, la risposta delle cellule Th17 isolate da pazienti Sclerodermici. (Truchetet ME et al., 2012).

È noto inoltre che anche l'N-acetilcisteina viene attualmente utilizzata come farmaco per il fenomeno di Raynaud. (Rosato E et al., 2009).

L'ultima parte di questo lavoro è volta all'analisi del ruolo della somministrazione di Iloprost o NAC in pazienti affetti da Sclerodermia nel modulare l'espressione della citochina IL-17A e delle altre isoforme della citochina IL-17 nella cute di questi pazienti (Figg.14-17).

Entrambi i farmaci inducono un aumento nella produzione di IL-17A, e questo aumento è più evidente nei pazienti trattati con NAC rispetto ai pazienti trattati con Iloprost.

In generale possiamo dire che per quanto riguarda tutte le citochine la somministrazione di NAC induce modificazioni più evidenti, sia che si tratti di un aumento o di una diminuzione dell'espressione della citochina.

Inoltre è stata valutata anche la variazione delle cellule Th17 e dei mastociti che producono IL-17A (Figg.18 e 19).

I soggetti trattati con Iloprost e NAC si comportano in modo molto diverso tra loro. Nello specifico i soggetti trattati con NAC presentano un aumento di cellule Th17 sia rispetto alle cellule totali che rispetto alle cellule T, mentre i soggetti trattati con Iloprost mostrano una diminuzione di entrambi i valori.

Nel caso dei mastociti che producono IL-17A i soggetti trattati con NAC mostrano un aumento delle cellule doppie positive rispetto al numero di cellule totali e una diminuzione delle cellule doppie positive rispetto al numero totale di mastociti.

Al contrario i soggetti trattati con Iloprost presentano una diminuzione in entrambi i casi.

I dati ottenuti indicano che le citochine IL-17C e IL-17F non hanno un andamento molto marcato nei soggetti trattati con NAC, e i soggetti trattati con Iloprost non presentano livelli di espressione delle isoforme della citochina IL-17 omogenei per poterne definire un ruolo preciso.

Al contrario, invece sembra che il trattamento con NAC determini un marcato aumento dell'espressione di cellule IL-17A positive e di cellule Th17 rispetto agli stessi soggetti prima del trattamento. Questo può suggerire un ruolo di queste cellule nel processo di guarigione dalla fibrosi, quindi attribuendo un ipotetico ruolo anti-fibrotico alla citochina IL-17A.

L'espressione di IL-17E risulta invece essere marcatamente diminuita nei soggetti trattati con NAC rispetto agli stessi soggetti al tempo 0. Questo può invece suggerire un ruolo pro-fibrotico di questa citochina.

L'ampliamento della casistica potrebbe confermare e irrobustire i dati ottenuti e aiutare a spiegare il ruolo delle altre citochine nella patogenesi della Sclerodermia.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol.* 2005;26(11):587-95. Epub 2005 Sep 15
- Bali G, Schwantzer G, Aberer F, Kraenke B, Aberer E. Discontinuing long-term Iloprost treatment for Raynaud's Phenomenon and systemic sclerosis: a single-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2011;20(1):13-21
- Bartholomew LG, Cain JC, Winkelmann RK, Baggenstoss AH. Chronic disease of the liver associated with systemic scleroderma. *Am J Dig Dis* 1964;9:43
- Berod, A., Hartman, B.K., Pujol, J.F., 1981. Importance of fixation in immunohistochemistry. Use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 844
- Bhaduaria S, Moser DK, Clements PJ et al. Genital tract abnormalities and female sexual function impairment in systemic sclerosis. *AM J Obstet Gynecol* 1995;172:580
- Brembilla NC, Chizzolini C., T cell abnormalities in systemic sclerosis with focus on Th17 cells., European Cytokine Network, accepted
- Carvalho A, Cunha C, Di Ianni M, Pitzurra L, Aloisi T, Falzetti F, Carotti A, Bistoni F, Aversa F, Romani L. Prognostic significance of genetic variants in the IL-23/Th17 pathway for the outcome of T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(11):1645-52.
- Cheng H, Tian J, Li Z, Zeng L, Pan B, Song G, Chen W, Xu K. TH17 cells are critical for skin-specific pathological injury in acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc.* 2012;44(5):1412-8
- Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2011; 10(5):276-81
- Clements P, Lachenbruch P, Siebold J et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1995;22:1281-1285
- D'Amico et al. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods.* 2009 Feb 28;341(1-2):1-18
- Di Trapani G, Pocchiari M, Fasullo C et al. Peripheral neuropathy in the course of progressive systemic sclerosis: light and ultrastructural study. *Ital J Neurol Sci.* 1982;3:341
- Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JR. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 1977; 20(4):975-84);
- Furuzawa-Carballeda J, Ortíz-Ávalos M, Lima G, Jurado-Santa Cruz F, Llorente L. Subcutaneous administration of polymerized type I collagen downregulates interleukin (IL)-17A, IL-22 and transforming growth factor- β 1 expression, and increases Foxp3-expressing cells in localized scleroderma. *Clin Exp Dermatol.* 2012;37(6):599-609
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):556-67

Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P, Ghersetich I, Lattanzio R, Pavan A et al. Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 1998; 41(2):327-34.

Gomez-Rodriguez J, Sahu N, Handon R, Davidson TS, Anderson SM, Kirby MR, August A, Schwartzberg PL. Differential expression of interleukin-17A and -17F is coupled to T cell receptor signaling via inducible T cell kinase. *Immunity*. 2009;31(4):587-97

Gordon RM, Silverstein A. Neurologic manifestations in progressive systemic sclerosis. *Arch Neurol* 1970;22:126

Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, West ML, Jenq RR, Holland AM, Kappel LW, Ghosh A, Tsai JJ, Rao UK, Yim NL, Smith OM, Velardi E, Hawryluk EB, Murphy GF, Liu C, Fouser LA, Kolesnick R, Blazar BR, van den Brink MR. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity*. 2012;37(2):339-50

Hietatharju A, Jaaskelaine S, Kalimo H, Hietarinta M. Peripheral neuromuscular manifestations in systemic sclerosis (scleroderma). *Muscle nerve* 1993;16:1204

Hussein MR, Hassan HI, Hofny ER, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AE et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol* 2005;58(2):178-84.

Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):149-62

Kitko CL, White ES, Baird K. Fibrotic and sclerotic manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(1 Suppl):S46-52

Kreuter A. Localized scleroderma. *Dermatol Ther*. 2012;25(2):135-47

Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2455-63

Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Immunol* 1995 1;155(5):2703-14

Lebeaux D, Sène D. Eosinophilic fasciitis (Shulman disease). *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012;26(4):449-58.

LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5

Liakouli V, Cipriani P, Marrelli A, Alvaro S, Ruscitti P, Giacomelli R. Angiogenic cytokines and growth factors in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2011;10(10):590-4

Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol*. 2012;92(4):753-64

- Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M et al. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Ann Rheum Dis* 2012;71(7):1227-34.
- Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol* 2006;33:275–84.
- Moulin C, Cavailles A, Balme B, Skowron F. Morphoea-like plaques revealing an eosinophilic (Shulman) fasciitis. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(8):e851-3
- Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *J Dermatol Sci* 2008;50(3):240-2
- Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *J Immunol*. 2012;188(8):3573-83
- Nash RA, McSweeney PA, Crofford LJ, Abidi M, Chen CS, Godwin JD et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for severe systemic sclerosis: long-term follow-up of the US multicenter pilot study. *Blood* 2007 15;110(4):1388-96
- Nau R, Christen HJ, Eiffert H. Lyme disease--current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(5):72-8
- Navi D, Saegusa J, Liu FT. Mast cells and immunological skin diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007;33(1-2):144-55
- Perera A, Fertig N, Lucas M et al. Clinical subsets, skin thickness progression rate and serum antibody levels in systemic sclerosis patients with antitopoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum* 2007;56:2740-2747
- Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166(3):255-63.
- Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(6):413-23
- Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(6):413-23
- Rosato E, Borghese F, Pisarri S, Salsano F. The treatment with N-acetylcysteine of Raynaud's phenomenon and ischemic ulcers therapy in sclerodermic patients: a prospective observational study of 50 patients. *Clin Rheumatol*. 2009;28(12):1379-84
- Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984; 27(6):645-53

- Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-89. Epub 2003 Oct 2
- Shapiro AP, Mesdger TA. Renal involvement in systemic sclerosis. In: *Diseases of kidney*, 4th ed, Scier R, Gottschalk C, Boston 1988, 2272
- Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:940-4
- Steen VD, Mesdger TA. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48:516-522
- Steen VD, Mesdgr TA: The palpable tendon friction rubs. An important physical examination finding in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1146
- Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, Martin GR, Black CM, Abraham D. Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest.* 2001;108(2):241-50
- Sun K, Hsiao HH, Li M, Ames E, Bouchlaka M, Welniak LA, Hagino T, Jagdeo J, Pai CC, Chen M, Blazar BR, Abedi M, Murphy WJ. IFN- γ receptor-deficient donor T cells mediate protection from graft-versus-host disease and preserve graft-versus-tumor responses after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol.* 2012;189(4):2033-42.
- Tee SI, Martínez-Escanamé M, Zuriel D, Fried I, Wolf I, Massone C, Cerroni L. Acrodermatitis Chronica Atrophicans With Pseudolymphomatous Infiltrates. *Am J Dermatopathol.* 2012 27. [Epub ahead of print]
- Truchetet ME, Allanore Y, Montanari E, Chizzolini C, Brembilla NC. Prostaglandin I(2) analogues enhance already exuberant Th17 cell responses in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(12):2044-50
- Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther*2011;13(5):R166
- Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, Fontao L, Meroni PL and Chizzolini C. Interleukin-17A+ cells are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated to the extent of skin involvement. *Arthritis and Rheumatism*, 2012, accepted
- Tuffanelli D, Winkelmann RK. Systemic sclerosis. A clinical study of 727 cases. *Arch Dermatol* 1961;84:359
- Walzer UA, Tyndall A, Ruszat R. Erectile dysfunction in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1083

Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C, Vrethem M, Bergstrom S, Forsberg P, Ernerudh J. Borrelia-specific interferon-gamma and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *J Infect Dis.* 2004;189(10):1881-91. Epub 2004 Apr 26

Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol.* 2010;32(1):17-31).

Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2007;179(10):7128-36

Zalaudek I, Leinweber B, Kerl H, Müllegger RR. Acrodermatitis chronica atrophicans in a 15-year-old girl misdiagnosed as venous insufficiency for 6 years. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52(6):1091-4