



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato di Ricerca in Medicina Clinica e Molecolare

***Basi cellulari e molecolari della
Graft-Versus-Host Disease***

Relatore: Chiar.mo Prof.

Attilio Olivieri

Tesi di Dottorato di: Dott.ssa

Elena Marinelli Busilacchi

XIV Ciclo
Triennio 2012-2015

INDICE

ABBREVIAZIONI	1
INTRODUZIONE	3
1. IL SISTEMA HLA	4
2. IL TRAPIANTO ALLOGENICO	6
3. LA GVHD	7
3.1 CLINICA DELLA GVHD CRONICA	10
3.2 PATOFISIOLOGIA DELLA cGVHD	13
3.3 MARKER BIOLOGICI DELLA GVHD	15
3.4 LINEE TERAPEUTICHE PER LA cGVHD	16
3.4.1 Proprietà immunomodulanti dei TKI	20
3.4.2 Proprietà' antifibrotiche ed antinfiammatorie dei TKI	23
3.4.3 Esperienze cliniche con i TKI nella cGVHD	24
SCOPO DELLA TESI	26
MATERIALI E METODI	
I. Caratterizzazione fenotipica, molecolare e funzionale dei fibroblasti di pazienti affetti da cGVHD e valutazione dell'attività degli inibitori delle tirosin-chinasi sui meccanismi molecolari di fibrosi	27
1 Colture di fibroblasti	28
2 Analisi immunofenotipica	28
3 Capacità di differenziazione multilineare dei fibroblasti sani e da cute con GVHD	
3.1 Differenziazione adipogenica	28
3.2 Differenziazione osteogenica	29
3.3 Differenziazione condrogenica	29
4 Analisi dell'espressione basale dei geni del collagene in RT-PCR	30
5 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo stimolazione con TGFβ	31
6 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo incubazione con Nilotinib	31

II. Studio in vitro dell'effetto immunomodulante degli inibitori delle tirosin-chinasi sulle cellule immunocompetenti	32
1 Separazione di cellule mononucleate	32
2 Coltura di cellule mononucleate con TKI	33
3 Analisi immunofenotipica	34
4 Studio del ciclo cellulare	37
5 Analisi delle citochine secrete	37
Analisi dei dati	37
RISULTATI	
I. Caratterizzazione fenotipica, molecolare e funzionale dei fibroblasti di pazienti affetti da cGVHD e valutazione dell'attività degli inibitori delle tirosin-chinasi sui meccanismi molecolari di fibrosi	38
2 Analisi immunofenotipica	39
3 Capacità di differenziazione multilineare dei fibroblasti sani e da cute con GVHD	
3.1 Differenziazione adipogenica	41
3.2 Differenziazione osteogenica	41
3.3 Differenziazione condrogenica	42
4 Analisi dell'espressione basale dei geni del collagene in RT-PCR	43
5 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo stimolazione con TGFβ	44
6 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo incubazione con Nilotinib	45
II. Studio in vitro dell'effetto immunomodulante degli inibitori delle tirosin-chinasi sulle cellule immunocompetenti	47
1 IMATINIB	47
2 NILOTINIB	48
3 DASATINIB	50
4 PONATINIB	51
5 Analisi delle citochine secrete	54
DISCUSSIONE	56
BIBLIOGRAFIA	63
RINGRAZIAMENTI	72

ABBREVIAZIONI

TCSE	Trapianto Di Cellule Staminali Ematopoietiche
CSE	Cellule Staminali Ematopoietiche
GVHD	<i>Graft Versus Host Disease</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i>
APC	<i>Antigen Presentig Cells</i>
IFN γ	Interferone γ
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Allo-TCSE	Trapianto Allogenico Di Cellule Staminali Ematopoietiche
MUD	<i>Matched Unrelated Donor</i>
GVL	<i>Graft Versus Leukemia</i>
aGVHD	<i>Acute Graft Versus Host Disease</i>
cGVHD	<i>Chronic Graft Versus Host Disease</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
IL	Interleuchina
LPS	Lipopolisaccaride
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
Th	Linfociti T helper
NK	Natural Killer
Treg	Linfociti T regolatori
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
ScGVHD	<i>Graft Versus Host Disease Scleroderma-like</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>

TKI	<i>Tyrosine-Kinase Inhibitor</i>
CCR	Chemochina CC Recettore
CsA	Ciclosporina
MTX	Metotrexato
ATG	Globulina Anti-Timocita
CD	Cluster di Differenziazione
ECP	Fotoaferesi Extracorporea
DC	Cellule Dendritiche
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
LMC	Leucemia Mieloide Cronica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EMA	<i>European Medicine Evaluation Agency</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
SSc	Sclerodermia o Sclerosi Sistemica
GITMO	Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo
Studio Nilo-Gitmo	<i>Prospective, phase I/II, non-randomized, open label, multicenter study to determine safety and efficacy of Nilotinib in a population with steroid-refractory/or steroid-dependent cGVHD. Codice EUDRACT 2010-023068-41</i>
MTD	Massima Dose Tollerata
ORR	<i>Overall Response Rate</i>
SAE	<i>Scale Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
TTF	Tempo di Fallimento del Trattamento
OS	<i>Overall Survival</i>
n-Fbs	Fibroblasti normali
GVHD-Fbs	Fibroblasti provenienti da pazienti con cGVHD
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell

INTRODUZIONE

Nel midollo osseo il differenziamento delle cellule del sangue avviene a partire dai progenitori primitivi conosciuti come cellule staminali.

Alla base di numerose patologie ematologiche vi è un'alterazione acquisita (es. aplasia midollare, neoplasie ematologiche) o congenita (emoglobinopatie) del compartimento delle cellule staminali.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) è una procedura complessa che prevede la completa sostituzione del tessuto midollare del paziente con cellule staminali ematopoietiche (CSE) di un donatore sano capace di ricostituire il sistema emopoietico e immunitario del ricevente.

Il raggiungimento di questo obiettivo dipende dalla realizzazione di tre fattori principali:

- la completa eradicazione dell'ematopoiesi dell'ospite stesso attraverso un regime massimale di chemio e/o radioterapia, noto come condizionamento, per "creare spazio" alle CSE del donatore e per eliminare eventuali cellule maligne residue;
- il superamento, ai fini dell'attecchimento, della barriera immunologica rappresentata dalle cellule immunocompetenti del paziente che sono responsabili del rigetto;
- il superamento della barriera immunologica, rappresentata dalle cellule immunocompetenti attive del donatore presenti nella sospensione delle cellule staminali infuse, responsabili della malattia del trapianto contro l'ospite *Graft-Versus-Host Disease, GVHD*). [1]

La sostituzione del compartimento staminale del paziente con le cellule del donatore determina la convivenza nello stesso individuo del patrimonio genetico di due soggetti differenti; il ricevente, in questo caso, diventa genotipicamente una chimera (termine mutuato dalla mitologia classica per definire una creatura con parti anatomiche derivate da individui differenti). L'analisi del chimerismo post-trapianto può essere effettuata tramite indagini citogenetiche, mediante la determinazione dei gruppi eritrocitari o tipizzazione HLA, oppure attraverso tecniche di PCR (*Polimerase chain reaction*) che amplificano regioni del genoma altamente polimorfiche. Attraverso queste metodiche, applicabili sia su sangue midollare che su sangue periferico, è possibile stabilire il chimerismo post-trapianto e seguirne l'andamento nel tempo.

In base alla persistenza o meno di cellule del ricevente a livello midollare o periferico si distinguono tre possibili differenti stati chimerici:

- chimerismo completo (assenza di residuo cellulare emopoietico del paziente)
- chimerismo misto (concomitante presenza di cellule del donatore e del ricevente)
- assenza di chimerismo (ricostituzione emopoietica autologa).

1. IL SISTEMA HLA

I geni che esercitano un effetto primario sulle reazioni umorali e cellulari determinanti la compatibilità tissutale sono raggruppati in un complesso cromosomico che prende il nome di Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC), definito nell'uomo sistema HLA (*Human Leucocyte Antigens*). Il sistema HLA è localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 6 (p21.3) e comprende una serie di geni che codificano per tre classi di molecole designate rispettivamente come antigeni di classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C, rappresentati da eterodimeri formati da due catene, di cui una altamente polimorfica e l'altra costituita dalla β 2-microglobulina), antigeni di classe II (HLA-DR, DQ, DP, formati da una catena α e da una catena β), e antigeni di classe III (comprendono fattori del sistema del complemento o citochine quali il $\text{TNF}\alpha$ e il $\text{TNF}\beta$). I prodotti dei geni HLA presentano un polimorfismo molto elevato, che tuttavia è ristretto in ambito familiare, dove esiste una probabilità di identità HLA di circa il 30% dei fratelli.

Gli antigeni HLA di classe I sono presenti costituzionalmente sulla maggior parte delle cellule nucleate dell'organismo e sulle piastrine, ma la loro espressione varia nei diversi tessuti e nelle differenti categorie di cellule. La loro massima espressione si ha sui linfociti dove rappresentano circa l'1% di tutte le proteine di membrana e fungono da bersaglio per i linfociti T citotossici nelle reazioni di rigetto.

Le molecole di classe II hanno una distribuzione più ristretta: sono infatti presenti solo sui linfociti B, sui linfociti T attivati, sulle cellule dell'endotelio vascolare e sulle cellule presentanti l'antigene (*Antigen Presenting Cells* APC come ad esempio le cellule dendritiche ed i macrofagi attivati). Gli antigeni HLA di classe II sono essenzialmente coinvolti nelle cooperazioni tra le varie popolazioni di cellule immunocompetenti per la regolazione della risposta autoimmune. I linfociti T, infatti, possono riconoscere un antigene estraneo solo se esso forma un complesso con un antigene HLA sulla cellula presentante l'antigene (tipicamente un macrofago).

L'espressione delle molecole HLA sulle cellule è sotto controllo di alcune citochine: l'interferone γ (IFN γ) ed il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) rappresentano dei potenti induttori dell'espressione dell'HLA su molti tipi di cellule che altrimenti presenterebbero solo una debole espressione di queste molecole e ciò è molto importante nel rigetto del trapianto. [2]

Gli antigeni HLA di classe I e II sono caratterizzati da un estremo polimorfismo, tale per cui la maggior parte degli individui risultano eterozigoti per tutti i loci HLA. Nonostante ci sia un numero teoricamente infinito di possibili combinazioni, si osserva che certi fenotipi HLA sono osservabili nelle diverse etnie con una frequenza decisamente superiore all'atteso. Questa osservazione pone il presupposto biologico grazie al quale sono stati resi possibili trapianti di progenitori emopoietici tra individui non appartenenti allo stesso nucleo familiare. La possibilità che vi sia un donatore HLA-compatibile nell'ambito della famiglia, è del 25%. Nei pazienti in cui non vi è un donatore compatibile familiare occorre avviare una ricerca nell'ambito delle banche di donatori volontari di CSE nazionali e internazionali.

Attualmente la tipizzazione ad alta risoluzione dei geni HLA con tecniche che si avvalgono della PCR ha soppiantato gli altri metodi. Il *gold standard* consiste in un'analisi dei loci di HLA A; B; C; DRB1 e DQB1. Se donatore e paziente possiedono gli stessi 5 alleli in entrambi gli aplotipi, la situazione si definisce *10/10 matched* [3]. Nella pratica, donatore e ricevente possono essere analizzati:

- per i loci HLA A, B, C e DRB1, ed in caso di compatibilità per tutti gli alleli la situazione viene definita *8/8 matched*
- per i loci HLA A, B, DRB1 ed in caso di compatibilità per tutti gli alleli la situazione viene definita *6/6 matched*

Sono tollerati più *mismatched* nel caso di trapianti di cellule da cordone ombelicale per la relativa immaturità delle CSE infuse. [4]

2. IL TRAPIANTO ALLOGENICO

La caratterizzazione del sistema HLA ha aperto la strada al trapianto allogenico (allo-TCSE), cioè al trapianto di cellule o tessuti tra due soggetti diversi della stessa specie.

L'allo-TCSE rappresenta ormai una procedura terapeutica consolidata nel trattamento di numerose emopatie sistemiche sia neoplastiche che non neoplastiche.

PATOLOGIE MALIGNE	PATOLOGIE NON MALIGNI
LEUCEMIE	S. DA INSUFF. MIDOLLARE
Leucemie (linfatica acuta; mieloide acuta o cronica)	Ipoplasie midollari congenite
Sindromi mielodisplastiche	Anemia aplastica severa
Mielofibrosi acuta	IMMUNODEFICIENZE
DISTURBI LINFOPROLIFERATIVI	Immunodeficienze congenite
Linfomi (Hodgkin o non-Hodgkin)	Sindrome di <i>Wiskott-Aldrich</i>
Mieloma multiplo	DISTURBI EMATOLOGICI
TUMORI SOLIDI	Talassemia major
	Anemia falciforme
	Neutropenia congenita
	Gravi disturbi piastrinici congeniti
	DISTURBI GENETICI NON EMATOLOGICI
	Osteopetrosi
	Mucopolisaccaridosi
	Leucodistrofie
	Altre patologie metaboliche rare
	MALATTIE AUTOIMMUNITARIE

Tabella 1. Principali indicazioni all'esecuzione di allo-TCSE

L'allo-TCSE prevede l'uso di cellule staminali prelevate da un donatore familiare o da banca e viene definito dalle seguenti caratteristiche [1]:

- fonte di CSE: midollo osseo, sangue periferico o cellule derivanti da sangue di cordone ombelicale
- familiarità con il donatore o disponibilità di un donatore non familiare o non correlato (*Matched Unrelated Donor*; MUD)
- grado di compatibilità che dipende dal numero di antigeni A, B e DR uguali tra donatore e ricevente.

Il trapianto allogenico è una procedura complessa con una mortalità trapianto-correlata del 10-15%. Tra le complicanze post allo-TCSE si distinguono quelle ad insorgenza precoce (tossicità correlata al regime di condizionamento; infezioni batteriche, virali e fungine; rigetto o, nel caso di malattie oncologiche, recidiva di malattia; malattia del trapianto contro l'ospite acuta e cronica) e ad insorgenza tardiva (disturbi di crescita, disturbi endocrinologici, cataratta, patologie a carico dell'osso, complicanze neurologiche, cardiopatia, pneumopatia di tipo restrittivo, nefropatia).

Va ricordato infine che il paziente precedentemente sottoposto ad allo-TCSE ha una probabilità 6-7 volte maggiore di sviluppare una seconda neoplasia e con un tempo di insorgenza più precoce rispetto alla popolazione generale. [2].

A seguito del trapianto allogenico tra donatore e ricevente si instaurano reazioni immunitarie bidirezionali. Queste sono responsabili sia delle principali complicanze del trapianto, quali fallimento dell'attecchimento (rigetto) e la GVHD, sia del vantaggioso effetto del trapianto contro cellule neoplastiche residue (*Graft-Versus-Leukemia*, GVL). [5,6]

La profonda immunosoppressione indotta dalle alte dosi di radio-chemioterapia pre-trapianto, che ha lo scopo di eradicare la malattia dal ricevente, riduce l'incidenza del rigetto nell'allo-TCSE da donatore HLA compatibile all'1-2% dei casi; il rigetto rappresenta un problema maggiore nei trapianti da donatore non familiare o nei trapianti non compatibili.

Sebbene la malattia del trapianto contro l'ospite o GVHD si associ a un maggior effetto GVL e quindi ad una minore percentuale di ricadute, tuttavia essa rappresenta una delle maggiori cause di morbilità e mortalità non trapianto-relata in soggetti sottoposti ad allotrapianto

3. LA GVHD

L'esistenza della *Graft-Versus-Host Disease* venne intuata nel 1959 da Barnes: nei suoi studi ormai storici, topi leucemici ricevevano una dose letale di irradiazione totale più midollo singenico o allogenico HLA compatibile. Mentre i riceventi di midollo singenico morivano tutti per recidiva di malattia, parte dei topi allotrapiantati guariva dalla leucemia, anche se quasi tutti morivano per una patologia, definita "*secondary disease*". [7] Le manifestazioni cliniche di tale patologia riguardavano principalmente cute, tratto

gastro-intestinale e fegato, ed apparivano simili a quelle osservate in topi neonati sottoposti a trapianto allogenico di tessuto splenico e in alcuni pazienti pediatrici con deficit immunitari che avevano ricevuto trasfusioni di sangue. [2]

Nel 1966 Billingham definì tre condizioni necessarie perché un paziente sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche sviluppi GVHD:

1. Il trapianto deve contenere cellule immunologicamente competenti
2. Il ricevente deve esprimere antigeni tissutali che non sono presenti nel donatore
3. Il paziente deve essere incapace di montare un'efficace risposta immunitaria, tale da eliminare le cellule trapiantate. [5]

La GVHD rappresenta a tutt'oggi una delle più frequenti complicanze del trapianto di cellule staminali allogeniche. Dalle diverse casistiche, per il trapianto di midollo HLA identico, l'incidenza della GVHD è del 30-50%; tale incidenza aumenta al 50-80% dei casi nei trapianti da MUD o familiari HLA parzialmente compatibili.

Ovviamente, non solo il tipo di trapianto e il grado di compatibilità donatore-ricevente influenzano l'incidenza della GVHD, ma anche il regime di profilassi impiegato e numerosi altri fattori [8].

La *Graft-Versus-Host Disease* classicamente veniva definita acuta (aGVHD) e cronica (cGVHD) in base al tempo di insorgenza (100 giorni dal trapianto); nella *Consensus Conference* dell'NIH (*National Institutes of Health*) del 2005 sono stati stabiliti dei criteri di classificazione sulla base dei sintomi clinici. [9,10]

La GVHD acuta insorge generalmente tra la prima settimana ed il secondo mese post-trapianto. All'esordio gli organi bersaglio risultano essere cute (81%), tratto gastrointestinale (54%) ed fegato (50%). [11]

La GVHD acuta è la conseguenza di una risposta infiammatoria mediata da linfociti T del donatore infusi nel ricevente, che riconoscono gli antigeni maggiori e minori di istocompatibilità dell'ospite.

Classicamente si distinguono tre fasi che conducono alla aGVHD,

1. Attivazione delle cellule APC, indotta dal regime di condizionamento che determina un danno tissutale, in particolare a livello della mucosa intestinale. Questo comporta la produzione di citochine proinfiammatorie come il $TNF\alpha$, le interleuchine (IL-1 e IL-6) e le chemochine da parte del ricevente, che amplificano l'attivazione precoce delle APC, oltre ad incrementare l'espressione di molecole di adesione, antigeni HLA, e

molecole costimolatorie a livello delle APC stesse. [12] Inoltre, la lesione del tratto gastrointestinale causata dal condizionamento è particolarmente importante perché porta alla traslocazione sistemica di ulteriori stimoli infiammatori, come ad esempio prodotti microbici quali l'LPS (lipopolisaccaride) o altre PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) che penetrano attraverso la mucosa intestinale danneggiata, attivando la risposta del sistema immunitario innato e promuovendo il rilascio delle citochine infiammatorie. Il sito iniziale di interazione tra le cellule APC dell'ospite ed i linfociti T del donatore risiede probabilmente a livello delle placche di *Peyer*, il tessuto linfatico secondario del tratto gastrointestinale.

2. Attivazione delle cellule T del donatore da parte delle APC dell'ospite, con conseguente loro proliferazione e differenziazione. In tale fase sembrerebbero avere un ruolo preponderante i linfociti T helper 1 (Th1), con rilascio di citochine proinfiammatorie quali IL-2, TNF α , IFN γ .

L'attivazione delle cellule immunitarie ha come conseguenza l'avvio di una rapida cascata biochimica intracellulare, che induce la trascrizione di una serie di proteine, tra cui le citochine ed i loro recettori.

3. Fase infiammatoria effettrice: qui entrano in gioco diversi tipi cellulari (linfociti T citotossici, linfociti T *Natural Killer*, macrofagi), molecole infiammatorie solubili (IFN γ , TNF α , IL-1, ossido nitrico macrofagico) e chemochine che guidano la migrazione dei linfociti T dagli organi linfoidi ai tessuti bersaglio. Il sistema immunitario innato e adattativo (linfociti T alloreattivi) lavorano in sinergia per amplificare il danno tissutale e inoltre promuovono l'infiammazione e la distruzione dei tessuti target.

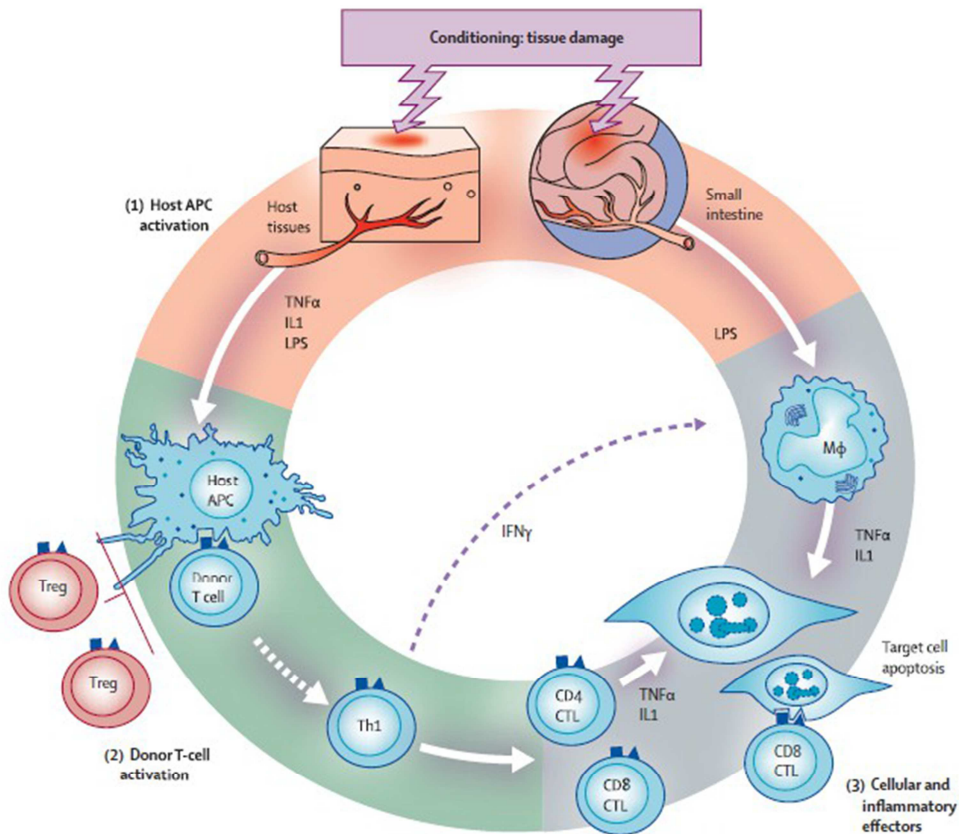


Figura 1. Fisiopatologia della GvHD acuta. Da Lancet, 2009, 373: 1550-61. Legenda: LPS: lipopolisaccaride; CTL: linfociti T citotossici.

Nonostante la patogenesi della aGVHD sia stata ben caratterizzata, sono ancora poche le informazioni circa i meccanismi fisiopatologici che portano allo sviluppo della GVHD cronica.

Circa il 20-25% dei pazienti pediatrici sottoposti a trapianto allogenico HLA-identico sviluppa una GVHD cronica. [13] Tale percentuale è significativamente più bassa rispetto a quella dell'adulto, in cui è riportata un'incidenza del 30-50%.

3.1 CLINICA DELLA GVHD CRONICA

Le manifestazioni cliniche della cGVHD rientrano nello spettro di quelli riscontrati in un gran numero di patologie ad eziologia autoimmune (sclerosi sistemica, sindrome di Sjogren, lupus eritematoso sistemico, bronchiolite obliterante, cirrosi biliare primitiva, citopenia autoimmune). Le lesioni patognomiche (i.e. sufficienti per stabilire la diagnosi) includono sclerosi, lesioni simil-lichen planus, poichiloderma, membrane

esofagee, fascite e bronchiolite obliterante. I *clinical feature* principali della cGVHD si riscontrano a livello orale, oculare, gastrointestinale, polmonare, epatico, articolare e cutaneo e possono limitarsi ad un singolo organo o tessuto, o possono dare un coinvolgimento sistemico (Tabella 2).

La cGVHD può svilupparsi:

- come evoluzione di una forma acuta (GVHD cronica progressiva)
- a distanza dalla completa risoluzione della GVHD acuta (GVHD cronica quiescente)
- in assenza di una precedente forma acuta (GVHD cronica “*de novo*”).

I principali fattori di rischio per GVHD cronica sono [11]:

- Storia di GVHD acuta
- Uso di donatori non familiari o HLA-*mismatched*
- Età avanzata del ricevente
- Positività per il Citomegalovirus
- Uso di donatori femmine per riceventi maschi
- Uso di cellule staminali ematopoietiche provenienti da sangue periferico.

Il *National Institute of Health*, nel 2005, ha proposto una revisione dei criteri di classificazione sulla base dei segni e dei sintomi tipici della forma cronica (*NIH Working Group Report on Diagnosis and Staging*). [9] Vengono riconosciuti:

- Segni e sintomi diagnostici: permettono la diagnosi di forma cronica in assenza di ulteriori segni o evidenza di coinvolgimento di altri organi
- Segni e sintomi distintivi: non si riscontrano normalmente nella GVHD acuta, ma che da soli non sono sufficienti per stabilire una diagnosi inequivocabile di GVHD cronica, necessitando quindi di altri test o del coinvolgimento aggiuntivo di altri organi
- Altre manifestazioni: manifestazioni di forma cronica rare, controverse o non specifiche di questa patologia, e che quindi non possono essere utilizzate per fare diagnosi di certezza
- Segni e sintomi comuni: manifestazioni riscontrabili sia nella GVHD acuta che nella GVHD cronica

Per la diagnosi di GVHD cronica sono necessari tre requisiti:

1. La distinzione dalla GVHD acuta
2. La presenza di almeno un segno clinico diagnostico di GVHD cronica o la presenza di almeno una manifestazione distintiva confermata da una biopsia adeguata o da un altro test rilevante
3. L'esclusione di ogni altra possibile diagnosi.

Organ/Site	Diagnostic	Distinctive	Other features*	Common (both acute and chronic)
Skin	Poikiloderma Lichen planus-like features Sclerotic features	Depigmentation	Sweat impairment Hypopigmentation Hyperpigmentation	Erythema Maculopapular rash Pruritus
Nails		Dystrophy Longitudinal ridging splitting, or brittle features		
Scalp/hair		Alopecia	Premature gray hair	
Mouth	Lichen planus type features	Xerostomia		Mucositis
Eyes		Dry eyes Keratoconjunctivitis sicca	Photophobia Blepharitis	
Genitalia	Lichen planus type features	Erosions, fissures, ulcers		
Gastrointestinal tract	Esophageal web Stricture or stenosis of the esophagus		Exocrine pancreatic insufficiency	Nausea Vomiting Anorexia, weight loss
Liver				Bilirubin or alkaline phosphatase, ALT or AST >2 x upper limit of normal
Lung	Bronchiolitis obliterans			Bronchiolitis obliterans organising pneumonia (BOOP)
Muscles, fascia, joints	Fasciitis, joint stiffness secondary to sclerosis	Myositis Polymyositis	Oedema Muscle cramps Arthralgia, arthritis	
Haematopoietic and immune			Thrombocytopenia Eosinophilia Lymphopenia Hypo- or hyper-gammaglobulinemia Autoantibodies	
Other			Peripheral neuropathy Myasthenia gravis Ascites, pericardial or pleural effusion	

* Can be considered the part of cGVHD symptomatology if the diagnosis is confirmed

Tabella 2. Segni e sintomi della cGVHD (*Consensus Conference NIH 2005*)

Il *NIH Working Group* ha proposto un nuovo sistema di *scoring* globale [9], che tiene in considerazione il numero di organi o siti coinvolti (“1”, “2”, “3 o più”, “coinvolgimento polmonare”) e la gravità con cui ogni organo è colpito.

Ogni organo riceve un punteggio secondo una scala composta da quattro gradi:

score 0 = nessun sintomo

score 1= sintomi lievi

score 2= sintomi moderati

score 3= sintomi gravi

Number of organs/sites	Mild	Moderate	Severe
1 site	Score 1	Score 2	Score 3
2 sites	Score 1	Score 2	Score 3
3 or more sites		Score 1	Score 3
Lung involvement		Score 1	Score 2

Tabella 3. *Score* globale della GvHD cronica, in relazione al numero e alla gravità degli organi coinvolti.

E’ possibile calcolare anche il *performance status scoring*, che va da 0 a 3, tuttavia questo parametro non viene preso in considerazione nel calcolo dello score globale.

Sulla base del *Global scoring system*, la GvHD cronica viene suddivisa in (Tabella 3):

- Lieve: coinvolgimento di uno o due organi, esclusi i polmoni, con *score* massimo 1
- Moderata: coinvolgimento di almeno un organo con *score* di 2, oppure 3 o più organi con *score* 1, oppure coinvolgimento polmonare con *score* 1.
- Grave: indica la presenza di uno *score* 3 in un organo, oppure di uno *score* 2 a livello polmonare.

3.2 PATOFISIOLOGIA DELLA cGVHD

La patofisiologia della cGVHD risulta da una complessa alterazione del sistema immunitario e l’esatto meccanismo non è ancora noto. Gli attori principali della cGVHD sono tre: i linfociti T (a), i linfociti B (b), e il pattern delle citochine infiammatorie e profibrotiche (c).

a) I linfociti T helper e T citotossici sono considerati gli effettori principali nello sviluppo della cGVHD: la reazione delle cellule T è proporzionale al grado di

incompatibilità dei loci HLA I e II del complesso maggiore di istocompatibilità. La T-deplezione attuata nel trapianto aploidentico si associa ad una diminuzione di comparsa sia della aGVHD che di cGVHD [14], al prezzo tuttavia di una maggiore tendenza al rigetto del trapianto ed alla ricaduta della patologia di base, a causa dell'assenza dell'effetto *Graft Versus Leukemia*.

Diversi dati sperimentali indicano un ruolo critico di una particolare sottopopolazione linfocitaria T di tipo regolatorio (Treg) e T helper 17 (Th17) nel controllo e nella prevenzione dell'autoimmunità: alterazioni significative nel numero e/o nell'efficacia funzionale del gruppo delle cellule regolatorie è stato osservato nelle patologie autoimmuni [14,15]. Studi recenti si sono focalizzati sui Treg e sulle cellule T effettrici (T effector) e la loro relazione con il trapianto di cellule ematopoietiche: questi appaiono regolatori dell'alloreattività e possono rappresentare degli importanti predittori del rischio di sviluppare GVHD dopo il trapianto di cellule allogeniche. [16-19]

b) L'alterata omeostasi dei linfociti B ha un ruolo cruciale nella patogenesi della cGVHD [20]. Durante la formazione delle immunoglobuline, la ricombinazione porta frequentemente alla sintesi di anticorpi autoreattivi, ma l'organismo è in grado di controllare o eliminare tali cellule B autoreattive. Nel corso dell'infiammazione, che spesso si accompagna alle fasi precoci della cGVHD, è possibile che le cellule B esprimenti anticorpi autoreattivi non siano adeguatamente controllate e possano attivarsi, determinando la produzione di autoanticorpi. Inoltre le cellule B sono essenziali in molte altre funzioni oltre alla secrezione di anticorpi, quali la presentazione diretta dell'antigene con conseguente attivazione dei linfociti T e la secrezione di citochine specifiche modulanti l'intensità e il tipo di risposta immune. Tali osservazioni sono sostenute da studi emergenti che mostrano una risposta clinica della cGVHD alla deplezione linfocitaria B mediante la terapia con l'anticorpo monoclonale Rituximab (RTX), rinforzando il concetto del ruolo in patogenetico delle cellule B nella cGVHD. [20,21]

Studi recenti hanno dimostrato che nella cGVHD *Scleroderma-like* (ScGVHD) sono presenti anticorpi autoreattivi rivolti verso il PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*). Il PDGFR è un recettore tirosinchinasico, presente su diversi tipi cellulari, tra cui i fibroblasti e le cellule endoteliali; in alcune fasi può essere espresso anche da altri tipi cellulari emopoietici e non. L'interazione del PDGF con il suo recettore PDGFR determina l'incremento dei radicali liberi dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*) intracellulari i

quali, a loro volta, sono alla base dell'aumentata sintesi del collagene; questo circuito appare cronicamente attivato nei fibroblasti sclerodermici e di pazienti con ScGVHD. Gli autoanticorpi anti-PDGFR avrebbero un ruolo determinante nell'innescare di tale processo, in quanto in grado di stimolare il *pathway* a valle in maniera analoga al PDGF [22-24].

c) Dati empirici indicano, oltre PDGF, anche TGF β (*Transforming Growth Factor β*) come citochina profibrotica con un ruolo rilevante nella patogenesi dei danni fibrotici: diversi modelli sperimentali suggeriscono che bloccando i segnali PDGF e TGF β si ha una diminuzione della fibrosi. [25]

Recenti dati in vitro mostrano inoltre che gli inibitori delle tirosin-chinasi (*Tyrosine-Kinase Inhibitor*, TKI), tra cui Imatinib e Nilotinib inibiscono sia PDGF che TGF β .

3.3 MARKER BIOLOGICI DELLA GVHD

Attualmente la diagnosi di GVHD cronica è essenzialmente clinica e può essere supportata dal reperto istologico dopo biopsia di un tessuto interessato; tuttavia studi recenti si sono concentrati sull'identificazione di potenziali marker biologici che aiutino a comprendere a fondo la patogenesi della malattia anticipandone la diagnosi e identificare nuovi bersagli molecolari per una terapia mirata e il monitoraggio del trattamento.

Diversi studi hanno esaminato l'associazione del contenuto cellulare dell'allograft del donatore ed il rischio di GVHD cronica, individuando un'associazione inversa tra il contenuto di cellule CD34+, cellule dendritiche e cellule NK ed il conseguente rischio di sviluppare questa patologia. Inoltre, valutando la ricostituzione immunologica post TCSE del ricevente si è evidenziato che il deficit di cellule Treg e di cellule NK possa determinare una conseguente cGVHD. [26-30]

Studi prospettici su campioni di sangue periferico di pazienti post allograft hanno evidenziato che lo sviluppo di cGVHD ad un aumento di TNF α , IL-10 e BAFF e una diminuzione di TGF β e IL-15. [31-34]

In campioni di cute di pazienti con cGVHD è stato riscontrato un aumento di cellule T-secerenti IFN γ . [35]

Tra i possibili *biomarker* si evidenzia anche uno squilibrio delle popolazioni immunitarie: ad esempio il bilancio T helper 1 / T citotossici e T helper 2 / T citotossici con una produzione aberrante di IFN γ e assenza di IL2. [36,37]

Sono anche emersi dei predittori per specifici gruppi fenotipici di cGVHD: ad esempio Inamoto et al. hanno scoperto il genotipo 926AG di CCR9 (chemochina CC recettore 9) è associato ad aumento del rischio di cGVHD cutanea [38]; Shimura et al. hanno dimostrato che il basso numero di cellule progenitori endoteliali circolanti CD34+CD133+ è associato allo sviluppo di cGVHD sclerodermica. [39]

Esistono diverse evidenze che dimostrano che lo sviluppo di cGVHD è associato all'aumento dei linfociti T CD3+, T helper 17, e entrambe le popolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+ *effector memory* circolanti. [40-43]

La presenza di autoanticorpi contro proteine del citoscheletro (tubulina, actina, miosina) hanno anche suggerito un ruolo dei linfociti T helper 2 derivanti dal donatore nello sviluppo della cGVHD. [44]

I lavori di Fujii et al. e Rozmus et al. suggeriscono che i marker diagnostici di cGVHD possono variare a seconda del tempo di insorgenza patologia: ad esempio un esordio precoce di cGVHD è associato ad un aumento di BAFF, IL-2RA e CD13 e una diminuzione di IFN- γ e IL-2, mentre l'insorgenza tardiva di cGVHD mostra un aumento di BAFF e una diminuzione di IL-4, IL-2 e FoxP3. [45,46]

Esistono poche evidenze sul rapporto tra la gravità della cGVHD e potenziali marker biologici: Barak et al. hanno correlato i livelli di TNF- α e IL-6 con la gravità della patologia.[47]; Li et al. hanno descritto una correlazione inversa tra il numero di Treg e l'estensione della cGVHD.[28]

Purtroppo non esistono ancora dei marcatori biologici utilizzabili come predittori della gravità della GVHD o come marker prognostici, né esistono dei precisi bersagli terapeutici.[48]

3.4 LINEE TERAPEUTICHE PER LA cGVHD

La terapia standard di prima linea della cGVHD è costituita da prednisolone 1 mg/kg/die e ciclosporina (CsA) 10 mg/kg/die con dose di CsA aggiustata per i livelli plasmatici. [11] La componente corticosteroidica è la principale parte della terapia mentre l'aggiunta della CsA ha il vantaggio di diminuire la necrosi vascolare secondo studi prospettici randomizzati. [49,50]

La ciclosporina inibisce l'immunità cellulo-mediata, la produzione T-dipendente di anticorpi e la produzione ed il rilascio di citochine in particolare dell'IL2. Dati sperimentali

mostrano che la CsA Agisce sui linfociti in modo specifico e reversibile, non deprime l'emopoiesi e non altera la funzione dei fagociti.

Gli steroidi (prednisone e metilprednisolone) bloccano diverse attività cellulari tra cui la produzione e la proliferazione di citochine (IL6, IL2, TNF, IFN γ), agendo più sull'immunità cellulomediata che su quella umorale. Il loro utilizzo è, purtroppo, gravato da numerosi effetti collaterali a carico dell'apparato cardiovascolare, gastrointestinale, osseo, metabolico e dermatologico ed, inoltre, possono determinare steroide-dipendenza.

I pazienti nei quali la terapia iniziale fallisce ricevono un trattamento di seconda linea. La tabella 4 indica le diverse strategie terapeutiche di seconda linea. Nonostante siano molti gli approcci disponibili, pochi sono gli studi clinici controllati e randomizzati finora compiuti, e poiché non esistono predittori di risposta utilizzabili nella pratica clinica giornaliera, tali trattamenti restano largamente empirici con aggiustamenti posologici in genere effettuati a discrezione del clinico. [42]

<p>Metilprednisolone (2-5 mg/kg)</p> <p>Farmaci immunosoppressivi:</p> <ul style="list-style-type: none">• Tacrolimus, MMF, Sirolimus (se non usato in profilassi) <p>Steroidi orali non assorbibili (in caso di GVHD intestinale)</p> <p>Globulina Anti-Timociti (ATG)</p> <p>Anticorpi monoclonali:</p> <ul style="list-style-type: none">• Anti-IL-2 receptor (CD25): Inolinomab, basiliximab, daclizumab, denikeukin difitox• Anti-TNFα: Infliximab, etanercept• Anti-CD52 (ampia specificità per cellule T): Alemtuzumab (Campath 1H)• Anti-CD147 (anti cellule T e B attivate): ABX/CBL• Anti-CD3 (ampia specificità per cellule T): Visilizumab, OKT3 <p>Pentostatina:</p> <ul style="list-style-type: none">• Inibitore dell'adenosina-deaminasi <p>Fotoferesi extracorporea¹:</p> <ul style="list-style-type: none">• Soppressione delle cellule T reattive e del rilascio di citochine, induzione di cellule T regolatorie <p>Cellule Staminali Mesenchimali:</p> <p>Effetto immunomodulatorio e di riparazione tissutale</p>
--

Tabella 4. Trattamento di seconda linea nella GVHD refrattaria agli steroidi.

Il Tacrolimus, macrolide a struttura ciclica, con una potenza 10 volte maggiore rispetto alla CsA, ha un meccanismo d'azione analogo alla CsA.

Il Micofenolato Mofetile, è un inibitore specifico, potente e reversibile dell'enzima IMPDH: attraverso la riduzione di GTP, provoca anche l'inibizione della sintesi di citochine e fattori di adesione dei linfociti, inibisce la proliferazione dei linfociti B e T e la produzione di ossido nitrico indotta da citochine da parte dell'enzima iNOS, uno dei maggiori implicati nel rigetto.

Il Sirolimus o Rapamicina, blocca l'attivazione IL-2 dipendente dei linfociti T: in particolare, inibisce una chinasi intracitoplasmica mTOR, bloccando il ciclo cellulare e attiva i linfociti T regolatori. [51]

Il Metotrexato (MTX) agisce come antagonista dell'acido folico, bloccando di conseguenza la formazione dei cofattori enzimatici necessari alla sintesi purinica e pirimidinica: con tale meccanismo blocca la sintesi di DNA e di RNA e agisce come antimetabolita, soprattutto verso le cellule caratterizzate da elevato *turnover* come quelle tumorali. Il MTX ha un'azione antinfiammatoria e immunosoppressiva: in vitro ed in vivo riduce l'attività dell'interleuchina-1, riduce risposta chemiotattica e l'attività proteasica delle cellule polimorfonucleate e inibisce la liberazione di istamina dalle cellule basofile.

L'ATG, globulina anti-timocita, è la frazione purificata di IgG ottenuta da sieri di animali (cavallo o coniglio) immunizzati con timociti umani o con linee T-cellulari. La sua azione immunosoppressiva è legata principalmente alla deplezione dei linfociti T citotossici circolanti attraverso la lisi complemento-mediata, l'attivazione T-cellulare e l'apoptosi; altri potenziali meccanismi d'azione includono la modulazione di molecole di adesione o l'espressione di recettori chemochinici e l'induzione di cellule T regolatrici.

L'Alemtuzumab è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD52 che provoca la morte di tutte le cellule esprimenti la glicoproteina CD52 sia attraverso la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente che la lisi cellulare complemento-mediata. Dato che l'antigene CD52 è ampiamente espresso sulla membrana dei linfociti B e T ma non su quella delle cellule staminali emopoietiche e dei progenitori emopoietici *committed*, l'Alemtuzumab svolge un'importante azione linfolitica determinando una profonda e prolungata deplezione soprattutto dei linfociti CD4+ e CD8+ mentre risparmia il comparto staminale emopoietico. [52]

Negli ultimi anni è stato valutato l'impiego di diversi farmaci biologici con azione immunosoppressiva. uno di questi è il Daclizumab, un anticorpo monoclonale anti CD25 che inibisce il pathway di attivazione linfocitaria dipendente da IL-2.

Un'altra categoria di farmaci è quella degli inibitori di citochine quali ad esempio gli anti-TNF. Il loro potenziale impiego nella pratica clinica è motivato dal ruolo che le citochine hanno nel sostenere la risposta infiammatoria.

Un ipotetico ruolo potrebbero avere i nuovi immunosoppressori biologici con azione selettiva contro il subset T cellulare, come l'Alefacept che blocca attivazione e proliferazione dei linfociti T e causa apoptosi selettiva degli stessi [53].

Attualmente i presidi più utilizzati sono rappresentati dalla ECP, dal Rituximab e l'inibitore delle tirosin-chinasi Imatinib.

Recenti pubblicazioni hanno evidenziato risultati positivi con la fotoferesi extracorporea (ECP). [54,55] Questa procedura consiste nella filtrazione dei leucociti del paziente mediante aferesi: queste cellule vengono poi incubate con un agente intercalante il DNA, l'8-metossipsoralene, esposte a luce ultravioletta e quindi reinfuse. Il preciso meccanismo d'azione dell'ECP non è ancora completamente chiarito: è stato dimostrato che le cellule sottoposte ad ECP vanno incontro ad apoptosi entro 48 ore. In vivo le cellule apoptotiche vengono fagocitate dalle cellule dendritiche (DC) immature, che di conseguenza si differenziano in DC tollerogeniche, le quali, a loro volta, inducono lo sviluppo di cellule Treg. [56]

Il rituximab è un anticorpo monoclonale diretto contro la molecola CD20, espressa sulla superficie cellulare dei linfociti B. L'esatta funzione del CD20 rimane ancora sconosciuta: vi sono evidenze che sia coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e nell'attivazione delle cellule B, attraverso il controllo del flusso di ioni calcio. Studi in vitro hanno consentito di evidenziare almeno tre possibili meccanismi d'azione del rituximab: la citotossicità mediata dall'attivazione del complemento, la citotossicità anticorpo-dipendente e l'induzione di apoptosi. [57-65] Al momento non è ancora stato evidenziato quale sia, in vivo, il meccanismo dominante; così come non si hanno ancora dati precisi sui meccanismi di resistenza all'azione dell'anticorpo monoclonale. Alcuni recenti studi hanno sottolineato l'importanza dei livelli di espressione del CD20, mentre altri hanno messo in luce il ruolo dei polimorfismi nei recettori Fc, quale possibile causa della variabilità della risposta in differenti pazienti. [66,67]

3.4.1 Proprietà immunomodulanti dei TKI

Gli inibitori delle tirosin-chinasi sono specifiche proteine che hanno il compito di regolare le vie di trasduzione del segnale all'interno della cellula fino al nucleo, principalmente attraverso il meccanismo della fosforilazione. I TKI bloccano direttamente il sito di legame dell'ATP nel dominio interno della proteina, inibendo così la fosforilazione dello specifico substrato e, di conseguenza, impedendo l'attivazione del *pathway* di trasmissione del segnale a valle. Ne consegue l'inibizione della proliferazione cellulare, il blocco dell'over-espressione di alcune proteine e l'intensificazione dei processi apoptotici. L'Imatinib Mesilato è un derivato 2-fenil-amino-pirimidinico ed inibisce l'attività tirosin-chinasica delle proteine Abl e Bcr-Abl, di c-KIT, recettore transmembrana ad attività tirosin-chinasica (detto anche KIT o CD117), di PDGFR e per il fattore di crescita cellulare *stem cell factor* (SCF). [68-70]

Lo studio della struttura cristallografica del dominio catalitico di Abl complessato con un omologo di Imatinib, ha dimostrato che il farmaco si lega alla proteina Bcr-Abl, lesione molecolare responsabile dello sviluppo della leucemia mieloide cronica (LMC), e la blocca nella conformazione inattiva, evitando così il trasferimento di fosfato dall'ATP ai substrati e quindi l'attivazione delle vie di segnalazione a valle. [71]

Recenti dati in vitro ed in vivo mostrano che questo farmaco inibisce i *pathways* intracellulari del PDGF e del TGF β che, se attivati, sono responsabili dell'espressione dei geni della matrice extracellulare. [72]

Nonostante i risultati clinici eccellenti che si sono ottenuti con Imatinib, una percentuale di pazienti non rispondono o ricadono in corso di trattamento (farmacoresistenza). Il principale meccanismo responsabile della riattivazione dell'attività chinasi nelle cellule leucemiche resistenti è rappresentato dall'insorgenza e dalla selezione di mutazioni puntiformi nel dominio tirosin-chinasico di Bcr-Abl. Tali mutazioni impediscono il legame dell'Imatinib alla proteina, in alcuni casi modificando residui amminoacidici critici per tale legame, oppure, più spesso, determinano una transizione dalla forma inattiva alla forma attiva della chinasi. Lo sviluppo della resistenza può anche essere dovuto all'acquisizione di eventi oncogenici aggiuntivi oppure all'attivazione di percorsi di traduzione del segnale alternativi, che rendono la crescita delle cellule leucemiche indipendenti dall'attività tirosin-chinasica di Bcr-Abl [73-76].

La ricerca ha portato allo sviluppo di TKI di seconda generazione che sono più efficaci su Bcr-Abl ed hanno un migliore profilo di tollerabilità. [77] I principali sono:

- Nilotinib che, pur legandosi come Imatinib alla conformazione inattiva di Bcr-Abl, è 30 volte più potente e attivo in vitro contro forme mutanti di Bcr-Abl (con l'eccezione della mutazione T315I), contro c-KIT, PDGFR e le chinasi della famiglia Src. [78-81]
- Dasatinib, il quale lega a sua volta Bcr-Abl, c-KIT, PDGFR, EphR (*Ephrin Receptors*) e le chinasi della famiglia Src. [82]
- Ponatinib che si è dimostrato un potente inibitore sia di Bcr-Abl anche nella variante mutata T315I che di altre chinasi come FLT3 (*Fms-Like Tyrosine Kinase 3*), FGF (*Fibroblast Growth Factors*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), oltre che c-KIT e PDGF. [83]

Il Nilotinib è un inibitore delle tirosin-chinasi di seconda generazione che nasce dallo studio razionale della struttura cristallografica dell'interazione di Imatinib con il dominio tirosin-chinasico di Abl. Si era infatti osservato che pur mantenendo lo scheletro di base della molecola e la sua ottima solubilità, alcune sue piccole modifiche avrebbero potuto incrementare l'affinità dell'inibitore per il recettore. Pur legandosi, come Imatinib, soltanto alla conformazione inattiva di Bcr-Abl, l'ottimizzazione della struttura dell'inibitore lo rende 30 volte più potente, molto più specifico e attivo, almeno in vitro contro 32/33 forme mutanti di Bcr-Abl (con l'eccezione della T315I). [84]

Gli eccellenti risultati ottenuti dagli studi di fase I/II hanno costituito la base per la recente approvazione del Nilotinib da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) e successivamente dall-*European Medicine Evaluation Agency* (EMA) come trattamento di seconda linea per pazienti con LMC resistenti o intolleranti al precedente trattamento con Imatinib.

I TKI possono interferire sia con l'immunità innata che con quella adattativa interagendo con differenti popolazioni cellulari: i linfociti B, i linfociti T, le cellule dendritiche e i macrofagi (Figura 2)

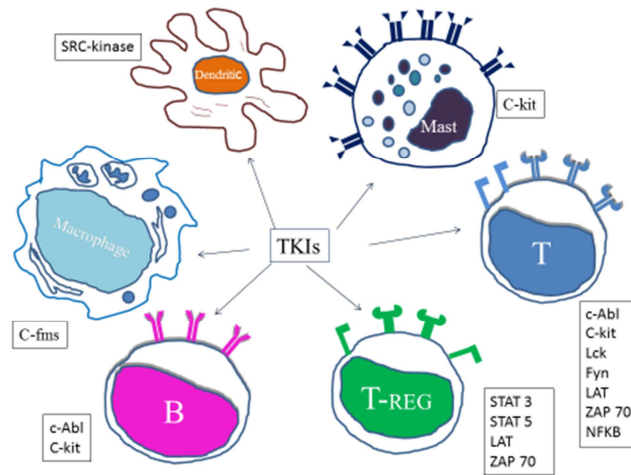


Figura 2: Dendritic: cellule dendritiche, Mast: mastociti, T: linfociti T, T-reg: linfociti Treg, B: linfociti B, Macrophages: macrofagi

Linfociti T: L'interazione tra i TKI e i linfociti T è stata recentemente rivista da Seggeweiss [85]; i dati sperimentali suggeriscono che l'Imatinib, il Dasatinib e il Nilotinib esercitano un'inibizione diretta di c-Abl e possono modulare la *pathway* correlato alle tirosin-chinasi del TCR. Questi specifici meccanismi, includono la riduzione della fosforilazione di ZAP70 e di altre chinasi (LAT, LCK, ERK1\2) unitamente alla riduzione dei livelli di NFkB.

I TKI in vitro legano la chinasi LCK (della famiglia SRC) e inibiscono il segnale LCK correlato già a concentrazioni terapeutiche [85,86]: tale condizione è importante in quanto la LCK è una delle maggiori protagoniste nella trasduzione prossimale del segnale TCR correlato.

Anche il Dasatinib ha proprietà inibenti la trasduzione del segnale, la proliferazione cellulare, la produzione di citochine, con risposta cellulare in vivo, senza indurre l'apoptosi. La combinazione con altri agenti immunosoppressori quali la ciclosporina A o la rapamicina, determinano una più potente inibizione dell'attivazione delle cellule T, suggerendo che l'inibizione target del LCK potrebbe essere utile per raggiungere una buona immunomodulazione [87]. Le varie sottopopolazioni di cellule T rispondono in maniera differente a tale inibizione con i linfociti T helper e le cellule T Naive che sono più sensibili rispetto ai linfociti T citotossici e alle cellule T memoria [88].

Linfociti Treg: il ruolo dei Treg nella patogenesi della cGVHD è ancora controversa e similmente il ruolo dei TKI nella modulazione di tale *pathway* non è ancora completamente caratterizzato. È stato dimostrato che l'Imatinib riduce significativamente

l'attivazione dei fattori di trascrizione STAT3 e STAT5 e inibisce la fosforilazione di ZAP70 e di LAT nei Treg [89,90]. In uno studio recente sul Nilotinib, l'inibizione della proliferazione e la capacità soppressiva dei Treg è dose dipendente, tuttavia la produzione di citochine da parte dei Treg e delle cellule CD4+CD25- è inibita da elevate concentrazioni di Nilotinib che superano la concentrazione media terapeutica del farmaco nel siero dei pazienti. Gli autori concludono che il Nilotinib non ostacola la funzionalità dei Treg a dosi clinicamente rilevanti, mentre la somministrazione del Nilotinib a lungo termine deve essere ancora approfondita. [91]

Linfociti B e altre popolazioni: l'Imatinib blocca l'attività della chinasi c-ABL a concentrazioni submicromolari [92]: conseguentemente l'inibizione del segnale del BCR riduce la proliferazione delle cellule B e la produzione delle IgM in vivo; questo può essere tradotto con una possibile inibizione delle risposte delle cellule B autoreattive.

Le cellule dendritiche e la loro interazione con le cellule T del donatore, in concomitanza di GVHD post TCSE sono state approfondite di recente. Le chinasi della famiglia SRC giocano un ruolo centrale nell'attivazione delle DC e alcuni studi suggeriscono che l'Imatinib abbia un effetto nel ridurre il numero e la funzionalità di tali cellule. Alte concentrazioni di Imatinib inibiscono la crescita delle cellule progenitrici CD34+ e dei monociti delle cellule dendritiche e ostacolano l'induzione dei linfociti T citotossici a causa del basso livello di espressione delle molecole costimolatorie. [93,94]

3.4.2 Proprietà antifibrotiche ed antinfiammatorie dei TKI

Numerosi studi suggeriscono che l'efficacia dei TKI nelle patologie autoimmuni sia dovuta non solo alla modulazione dell'immunità adattativa, ma anche all'interferenza con meccanismi di immunità innata e dell'infiammazione.

Il potenziale dell'Imatinib e degli altri TKI come agenti terapeutici antifibrotici, fu inizialmente supportato dall'efficacia evidenziata nella fibrosi dermica bleomicina-indotta in modelli murini. In questi modelli l'Imatinib riduce potentemente il numero dei miofibroblasti, l'ispessimento e il contenuto di collagene cutaneo in maniera dose-dipendente e in dosi ben tollerate [95,96]. Simili risultati sono stati ottenuti sia con Dasatinib che con il Nilotinib [97,98]. Nello spettro clinico l'Imatinib si è dimostrato un efficace antifibrotico nei modelli animali sia a livello polmonare, renale, cardiaco ed epatico. [99-101]

Nel *setting* clinico l'Imatinib si è dimostrato di considerevole efficacia nei vari disturbi fibrotici, tra cui pazienti con cGVHD sclerotica refrattaria e un numero considerevole di pazienti con sclerosi sistemica (SSc) refrattaria e disturbi misti del connettivo, che includono fibrosi cutanea progressiva e fibrosi polmonare. [102]

3.4.3 Esperienze cliniche con i TKI nella cGVHD

Dati retrospettivi suggeriscono che la somministrazione di TKI precedentemente e successivamente a un TCSA possa influenzare l'eventuale sviluppo di una GVHD. Alcuni autori hanno osservato un'aumentata incidenza di GVHD acuta e un trend lievemente minore per la GVHD cronica in pazienti allotrapiantati che sono stati ritrattati con Imatinib per una ripresa di leucemia mieloide cronica; al contrario, in coloro che ricevevano l'Imatinib prima, si evidenziava un'incidenza più bassa di cGVHD. [103-105]

Il TKI di seconda generazione Nilotinib presenta, rispetto all'Imatinib, un migliore profilo di tollerabilità [106-108], elemento importante specialmente in pazienti compromessi con cGVHD steroide-refrattaria. Gli studi in vitro suggeriscono che l'effetto inibitorio del Nilotinib sul PDGFR non è inferiore a quello dell'Imatinib per livelli sierici raggiunti in somministrazione giornaliera rispettivamente di 800 mg e di 400 mg. Ciò deve essere rilevato in considerazione della problematica che interessa a volte la tolleranza all'Imatinib per cui più del 80% dei pazienti riduce la dose giornaliera a un quarto del dosaggio standard, con conseguente diminuzione della concentrazione plasmatica e un minore effetto terapeutico. Questo è stato il razionale per l'avviamento di uno studio multicentrico di fase III per il trattamento della cGVHD steroide-refrattaria con il Nilotinib (Studio Nilotinib-GITMO).

Lo studio Nilotinib-GITMO è uno studio prospettico di fase I-II, non randomizzato, *open label* e multicentrico in una popolazione con cGVHD steroide-refrattaria o steroide-dipendente (Codice EUDRACT 2010-023068-41; Prospective, phase I/II, non-randomized, open label, multicenter study to determine safety and efficacy of Nilotinib in a population with steroid-refractory/or steroid-dependent cGVHD.) ideato dal "Gruppo Trapianti" della Clinica di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria - Ospedali Riuniti di Ancona e proposto al GITMO (Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo e cellule staminali emopoietiche e terapia cellulare).

Gli obiettivi primari dello studio sono:

- In fase I la valutazione della sicurezza del Nilotinib e definizione della Massima Dose Tollerata (MTD) del farmaco intesa come la manifestazione di qualsiasi tossicità di grado >3 dopo almeno 30 giorni di trattamento;
- In fase II definizione dell'efficacia del Nilotinib (utilizzando la MTD precedentemente determinata) in una popolazione affetta da cGVHD refrattaria allo steroide. In questa fase, l'*end-point* primario è l'*Overall Response Rate* (ORR), definito come un obiettivo miglioramento al 6° mese, secondo i criteri modificati del *National Institutes of Health Consensus Conference*, ripresi dai criteri NIH 2005, associato alla assenza di criteri di fallimento.

Gli obiettivi secondari invece sono:

- Riduzione o Interruzione del concomitante trattamento immunosoppressivo (steroidi, Fotoferesi Extra-Corporea, Ciclosporina-A).
- Valutazione della tolleranza la Nilotinib durante i 6 mesi di terapia: Incidenza di SAE (Grado >3 secondo la *Scale Common Terminology Criteria for Adverse Events*) nei pazienti con cGVHD refrattaria.
- Valutazione dell'attività del Nilotinib in pazienti con: fibrosi cutanea; fibrosi polmonare e/o ipertensione polmonare; fibrosi viscerale. Appropriati allegati di valutazione saranno usati per misurare la risposta in questi distretti, secondo il *Work Sheet* di valutazione della cGVHD secondo i criteri NIH e secondo il *Rodnan Score* modificato.
- TTF (tempo di fallimento del trattamento).
- *Overall Survival* (OS) a partire dall'inizio della terapia con Nilotinib.
- Valutazione mediante dei sintomi dei pazienti cGVHD *symptoms scale* NIH

All'interno di questo protocollo si sono effettuati alcuni studi biologici tra cui la valutazione della farmacocinetica del Nilotinib e l'attività in vitro del farmaco sulle popolazioni linfocitarie e sui fibroblasti di pazienti con cGVHD.

SCOPO DELLA TESI

Obiettivo principale del seguente studio è valutare due aspetti significativi della patogenesi della GVHD cronica, quali la produzione di collagene da parte dei fibroblasti della cute che determina la fibrosi e l'azione dei TKI sulla cellule del sistema immunitario, ed individuare eventuali bersagli molecolari utilizzabili per nuove strategie di trattamento.

I Caratterizzazione fenotipica, molecolare e funzionale dei fibroblasti di pazienti affetti da cGVHD e valutazione dell'attività degli inibitori delle tirosin-chinasi sui meccanismi molecolari di fibrosi

Lo scopo dello studio è stato quello di analizzare in vitro le differenze esistenti tra i fibroblasti sani e quelli con cGVHD, in termini di *pathways* molecolari di fibrogenesi, e di verificare nei fibroblasti patologici l'esistenza di alterazioni fibrotiche precoci; inoltre, si è voluto valutare l'effetto della citochina fibrosante TGF β sul fibroblasto normale in termini di espressione genica. I fibroblasti primari patologici sono stati ottenuti da colture di biopsie di cute di pazienti con cGVHD raccolte nell'ambito del Protocollo Nilotinib-GITMO (codice EUDRACT 2010-023068-41) approvato presso il Comitato etico dell'Azienda Ospedaliera Universitaria - Ospedali Riuniti di Ancona.

II Studio in vitro dell'effetto immunomodulante degli inibitori delle tirosin-chinasi sulle cellule immunocompetenti

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'azione immunomodulante degli inibitori delle tirosin-chinasi (Nilotinib, Dasatinib, Imatinib e Ponatinib) sulle popolazioni linfocitarie con particolare attenzione alle sottopopolazioni T regolatorie e T effettrici.

MATERIALI E METODI

I. Caratterizzazione fenotipica, molecolare e funzionale dei fibroblasti di pazienti affetti da cGVHD e valutazione dell'attività degli inibitori delle tirosin-chinasi sui meccanismi molecolari di fibrosi

In questo studio sono state utilizzate 6 biopsie di cute prelevate dai pazienti affetti da GVHD, nell'ambito del protocollo Nilotinib-GITMO "*Prospective, phase I/II, non-randomized, open label, multicenter study to determine safety and efficacy of Nilotinib in a population with steroid-refractory/or steroid-dependent cGVHD*".

La fase preliminare è stata effettuata su fibroblasti primari provenienti da una linea cellulare (N-Fbs) con lo scopo di verificare le condizioni sperimentali ottimali per l'attivazione del *pathway* profibrotico indotto da TGF- β in un fibroblasto normale, permettendo così di disporre di un controllo positivo di riferimento nei confronti del quale testare le alterazioni patologiche; in seguito sono stati studiati i fibroblasti con cGVHD (GVHD-Fbs) allo scopo di esaminare meccanismi molecolari profibrotici e alterazioni fibrotiche precoci presenti in condizioni basali; infine è stata valutata l'attività inibitoria di Nilotinib nei confronti dei *pathways* profibrotici attivati.

Sesso	
M / F	2 / 4
Età	
Media (range)	60 (43-72)
Diagnosi	
GVHD cronica cutanea	6

Tabella 5. Caratteristiche dei 6 pazienti da cui è stata prelevata la biopsia di cute

1 Colture di fibroblasti

Le biopsie di cute dei pazienti con cGVHD sono state tagliuzzate e fatte aderire alla superficie di una fiasca. Una volta che i campioni hanno aderito alla plastica è stato aggiunto il terreno di coltura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, EuroClone*) supplementato con il 20% di FBS (*Fetal Bovine Serum, EuroClone*), 2 mM di L-glutamina (*Biological Industries*) e 10 UI/ml di Penicillina/Streptomicina (*Biological Industries*) e sono stati incubati a 37°C in 5% CO₂.

Una volta che le cellule sono arrivate a confluenza sono state staccate tramite tripsina (*Trypsin EDTA, Biological Industries*) e riseminate in altre piastre in una split ratio conseguente alle necessità sperimentali.

Per lo svolgimento dei saggi biologici sono state utilizzate le colture cellulari dal passaggio 2 al passaggio 6.

2 Analisi immunofenotipica

Le cellule sono state studiate in citofluorimetria per l'espressione di antigeni di superficie: sono state marcate con anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi a diversa fluorescenza (*Fluoroisothiocyanate-FITC; Phycoerytrin-PE; Peridinin Chlorophyll Protein Cyanin5.5 –PerCP-Cy 5.5*) per la rilevazione delle molecole: CD90 (*Miltenyi*), CD105 (*Miltenyi*), CD44 (*BD Biosciences*), CD34 (*BD Biosciences*), CD45 (*BD Biosciences*), CD146 (*Miltenyi*), CD117 (*Miltenyi*).

Le cellule da analizzare sono state incubate a temperatura ambiente al buio per 30 minuti e studiate attraverso un citofluorimetro a flusso FACS CANTO II (*Becton Dickinson*).

Sono stati memorizzati almeno duecentomila eventi per campione ed analizzati utilizzando il programma FACS DIVA SOFTWARE (*Becton Dickinson*).

3 Capacità di differenziazione multilineare dei fibroblasti sani e da cute con GVHD

3.1 Differenziazione adipogenica

Per la differenziazione dei fibroblasti in adipociti è stato utilizzato il terreno commerciale *NH AdipoDiff (Miltenyi Biotec)*. Cinquantamila cellule sono state seminate in una piastra da 35 mm di diametro in 1,5 ml di terreno, con Penicillina (800 U/ml), Streptomicina (0,8 µg/ml) ed Anfotericina B (0,002 µg/ml). La coltura è stata incubata in termostato a 37°C e 5% di CO₂ ed il terreno è stato sostituito ogni 3 giorni con terreno fresco nella stessa quantità.

Al ventunesimo giorno di coltura le cellule sono state colorate tramite *Oil Red O*, (*Sigma-Aldrich*), colorante lipofilo rosso: dopo questa colorazione gli adipociti appaiono al microscopio ottico come cellule rotondeggianti con accumuli lipidici di colore arancio-rosso.

3.2 Differenziazione osteogenica

Il terreno di coltura utilizzato per promuovere la differenziazione delle cellule in osteociti è il *NH OsteoDiff* (*Miltenyi Biotec*). Trentamila cellule sono state seminate in una piastra da 35 mm di diametro in 1,5 ml di terreno, con Penicillina (800 U/ml), Streptomicina (0,8 µg/ml) ed Anfotericina B (0,002 µg/ml). La coltura è stata incubata in termostato a 37°C e 5% di CO₂ ed il terreno è stato sostituito ogni 3 giorni, aggiungendo quello fresco nella stessa quantità.

Al decimo giorno di coltura le cellule sono state fissate in formalina al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente, lavate in acqua deionizzata, incubate sotto luce diretta per un'ora con Nitrato d'Argento al 5%, e fissate tramite una soluzione acquosa di Sodio Tiosolfato al 5%. Con questo tipo di colorazione, denominata *Von Kossa*, i depositi di calcio vengono sostituiti da quelli d'argento e appaiono neri.

3.3 Differenziazione condrogenica

Il terreno di coltura utilizzato per promuovere la differenziazione delle cellule in condrociti è il *NH ChondroDiff* (*Miltenyi Biotec*). Duecentocinquantamila cellule sono state trasferite in una provetta conica di polipropilene contenente 1,5 ml di terreno, con Penicillina (800 U/ml), Streptomicina (0,8 µg/ml) ed Anfotericina B (0,002 µg/ml). Le cellule sono state centrifugate per 5 minuti a 1800 rpm a temperatura ambiente per formare un pellet. La coltura cellulare è stata incubata in termostato a 37°C e 5% di CO₂. Il terreno è stato cambiato ogni 3 giorni e, al ventiquattresimo giorno di coltura, il pellet è stato incluso in paraffina, tagliato al microtomo e le sezioni poste su un vetrino sono state colorate con *Alcian Blu*.

4 Analisi dell'espressione basale dei geni del collagene in RT-PCR

Dopo almeno 48h di *starvation* (0,2% FBS), dai fibroblasti normali e da quelli dei pazienti con cGVHD in coltura allo stesso passaggio, è stato estratto l'RNA totale usando il kit *RNeasy Mini Kit (Quiagen)* valutandone la purezza (rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 nm) e quantificandolo tramite spettrofotometro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

Per ogni campione analizzato è stato retrotrascritto 1 µg di RNA totale mediante 4 µl di *SuperScript VILO MasterMix (Invitrogen)* e acqua RNasi-free per arrivare a 20 µl finali di reazione. Le condizioni di retrotrascrizione sono: un primo step a 25°C per 10 minuti, un secondo a 42°C per 60 minuti, un terzo di sintesi del cDNA a 42°C per 45 minuti ed uno step finale a 85°C per 5 minuti.

I prodotti di retrotrascrizione (cDNA) così ottenuti sono stati poi utilizzati per una *Real-Time PCR (7500 FAST Real Time PCR; Applied Biosystem)* utilizzando la *Sybr Green Mix for qPCR (SYBR® Select Master Mix; Applied Biosystem)*. Sono stati studiati i geni COL1α1, COL1α2 attraverso i rispettivi *primers forward e reverse* e, come gene di controllo, è stato usato il GAPDH.

Gene	Sequenza primer (5'-3')	Dimensione (bp)	T annealing (°C)
COL1α1	AAGAGGCGAGAGAGGTTTCC (Fw) CACCTTAGCACCATCGTTG (Rev)	107	52,6
COL1α2	GTCCCAGTGGTGAAGAAGGA (Fw) GAAGACCACGAGAACCAGGA(Rev)	105	58,4
GAPDH	TCAAGGCTGAGAACGGGAA(Fw) GACTCCACGACGTACTCAGC(Rev)	115	53,6

Tabella 6. Sequenza dei *primer* utilizzati in RT-PCR, dimensione dei prodotti amplificati e temperature di *annealing*.

Per ogni reazione di amplificazione la CT (*threshold cycle*) è stata posizionata all'inizio della fase esponenziale di amplificazione, e la quantificazione dei relativi livelli di espressione sono stati effettuati confrontandoli con curve standard del target endogeno di controllo.

5 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo stimolazione con TGFβ

I fibroblasti normali e patologici, in condizioni di *starvation*, sono stati incubati con la citochina TGF β alla concentrazione di 10ng/ml (0,04 nM) allo scopo di verificarne la capacità stimolatoria tramite la successiva analisi di espressione dei geni del collagene mediante *Real-Time PCR* dopo 48 ore.

6 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo incubazione con Nilotinib

In condizioni di *starvation*, i fibroblasti patologici sono stati coltivati con diverse concentrazioni di Nilotinib (0 μ M, 1 μ M, 2 μ M; *Santa Cruz Biotechnology*) o di un inibitore del recettore del TGF β (SB431542; 10 μ M). Le cellule sono state incubate a 37° C in 5% CO₂ per 48 ore e successivamente la capacità inibitoria del TKI è stata verificata studiando l'espressione dei geni del collagene mediante *Real-Time PCR*.

II. Studio in vitro dell'effetto immunomodulante degli inibitori delle tirosin-chinasi sulle cellule immunocompetenti

In questo studio sono stati utilizzati 20 campioni di sangue periferico ottenuto da donatori sani che afferiscono all'Unità di Medicina Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria - Ospedali Riuniti di Ancona per la donazione degli emocomponenti.

Le cellule mononucleate sono state messe in coltura con diverse concentrazioni di TKI (bassa, terapeutica e sovramassimale) in assenza o in presenza di un agente stimolante mitogeno (fitoemoagglutinina, PHA; *ThermoFisher Scientific*) e sono state poi analizzate mediante citofluorimetria che permette di valutare i cambiamenti di numero delle diverse popolazioni cellulari e nella loro vitalità. Si è inoltre studiata la produzione di citochine infiammatorie del surnatante delle colture cellulari mediante *Bio-Plex ELISA (Bio-Rad)*.

Sesso	
M / F	16 / 4
Età	
Media (range)	38 (19-59)
Gruppo sanguigno	
A / B / AB	4 / 12 / 6

Tabella 7. Caratteristiche dei 20 donatori di sangue periferico

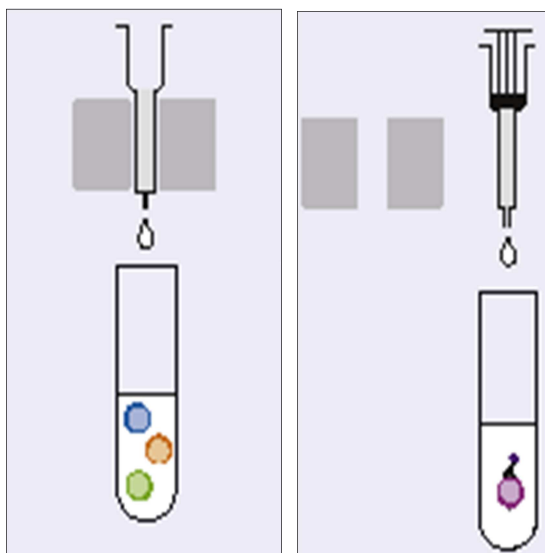
1 Separazione di cellule mononucleate

Le cellule mononucleate del sangue periferico (*peripheral blood mononuclear cell; PBMC*) sono state isolate mediante stratificazione su gradiente di *Ficoll (MPBiomediacals)* e centrifugazione a 1500 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente; l'anello di cellule mononucleate che si è formato tra i due gradienti è stato recuperato e lavato in PBS (*Dulbecco's Phosphate-buffered saline; BioWest*) mediante centrifugazione a 2000 rpm per dieci minuti a temperatura ambiente.

I PBMC così ottenuti sono stati contati tramite *coulter (coulter ACT8; beckman coulter)*.

Per lo studio delle popolazioni Treg e T effector, i linfociti CD3+ sono stati isolati mediante separazione immunomagnetica *MACS Cell Separation kit (Miltenyi Biotec)* utilizzando le *CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec)*.

In breve, le PBMC sono state incubate per 10 minuti a 4°C con l'anticorpo anti-CD3; al termine dell'incubazione sono state lavate con PEB buffer (PBS con 2mM EDTA e 0,05% BSA) e centrifugate a 1800 rpm per 10 minuti.



Quindi le cellule legate agli anticorpi e alle microbiglie sono state raccolte in una colonna ed esposte ad un magnete: ciò che fluisce attraverso la colonna può essere raccolto come frazione negativa, priva di cellule marcate (CD3-).

Successivamente la colonna è stata rimossa dal separatore magnetico e, premendo uno stantuffo, si è recuperata la frazione di cellule positiva (CD3+).

Le cellule raccolte sono state contate, ed è stata valutata la loro purezza e vitalità mediante citofluorimetria.

2 Coltura di cellule mononucleate con TKI

I linfociti separati o le PBMC, sono stati coltivati in una piastra da 24 pozzetti ad una concentrazione di 1×10^6 cellule per pozzetto in terreno RPMI (*EuroClone*) supplementato con il 20% di FBS (*EuroClone*) inattivato al calore, con 2 mM di L-glutamina (*EuroClone*) e 10 UI/ml di Penicillina/Streptomicina (*EuroClone*). Le colture sono state eseguite con diverse concentrazioni di Imatinib (0 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M; *Santa Cruz Biotechnology*), di Nilotinib (0 μ M, 0,5 μ M, 2 μ M e 10 μ M; *Santa Cruz Biotechnology*), di Dasatinib (0 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM; *Santa Cruz Biotechnology*) e di Ponatinib (0 nM, 1 nM, 10 nM, 50 nM e 100 nM; *Santa Cruz Biotechnology*) in assenza o presenza di PHA (*Phytohemagglutinin; ThermoFisher Scientific*); le cellule sono state incubate a 37° C in 5% CO₂ per 96 ore.

3 Analisi immunofenotipica

Al termine dell'incubazione le cellule ottenute sono state analizzate al citofluorimetro (*BD FacsCantoll*) marcandole per la rilevazione delle seguenti molecole:

(Fluoroisothiocyanate-FITC; Phycoerythrin-PE; phycoerythrin with cyanin-7- PE-Cy7; Peridinin Chlorophyll Protein-PerCP; Allophycocyanin-APC; Allophycocyanin with cyanin-7- APC Cy7; BD Biosciences; 7-aminoactinomycin D 7AAD).

Le cellule non separate (PBMC) sono state marcate per la rilevazione delle seguenti molecole:

- pannello T-B-NK e studio della vitalità: FITC CD4, PE CD16-CD56, 7-AAD, PE-Cy7 CD3, APC CD25, APC-Cy7 CD19

Le diverse popolazioni linfocitarie sono state così caratterizzate:

- CD3+: Linfociti T
- CD3+CD4+: Linfociti T helper
- CD3+CD4+CD25+: Linfociti T attivati, linfociti T memoria e Treg
- CD3+CD4-: Linfociti T citotossici
- CD3+CD16+CD56+: Linfociti T NK
- CD3-CD16+CD56+: Cellule NK
- CD3-CD19+: Linfociti B

Inoltre la negatività per il 7AAD identifica la popolazione delle cellule vitali.

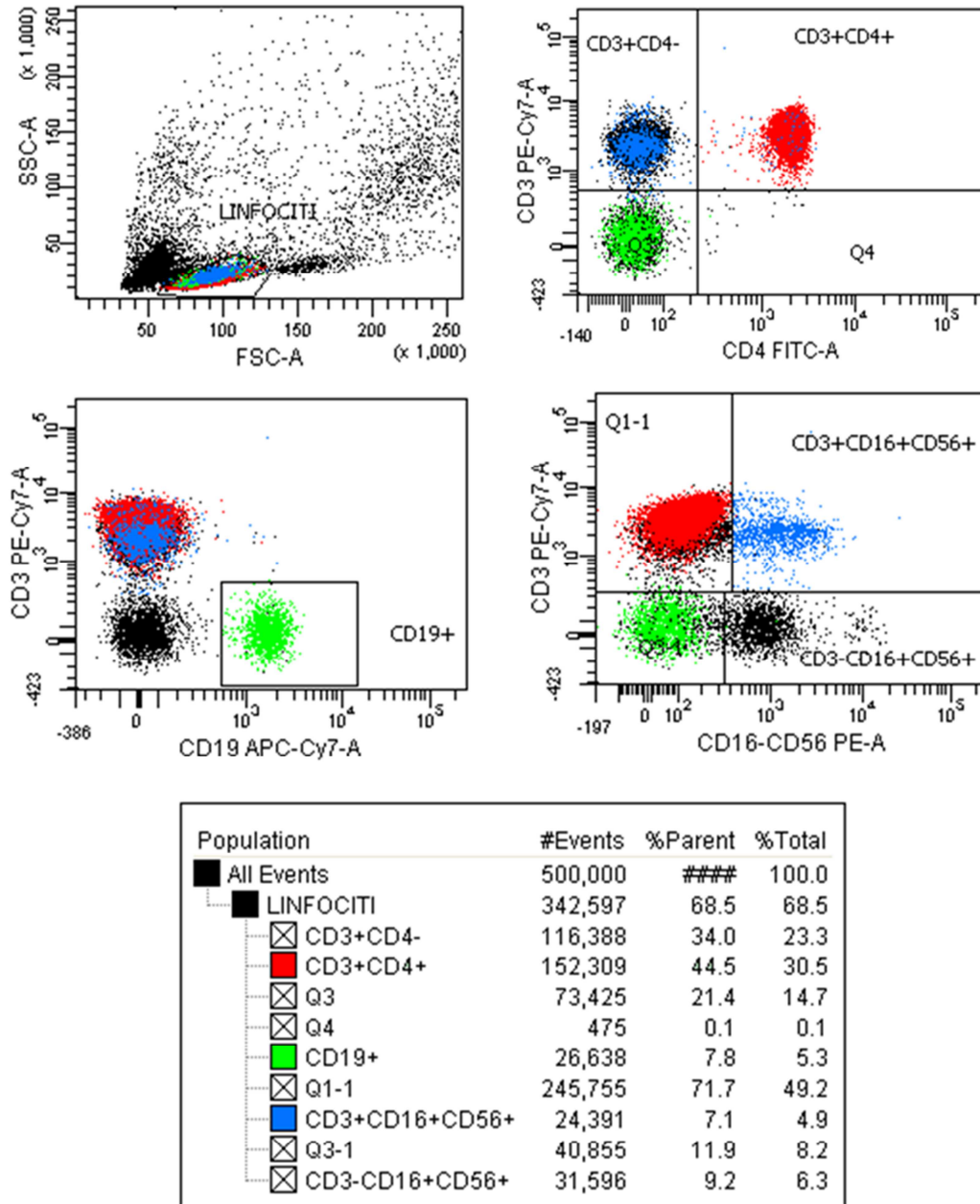


Figura 3. Strategia di *gating* per studiare le popolazioni T, B, NK

Le cellule CD3+ separate sono state marcate per la rilevazione delle seguenti molecole:

- per i T-Reg: FITC CD4, PE CD45RA, PerCP-Cy5.5 FOXP3, PE-Cy7 CD127, APC CD25, APC-Cy7 CD3

controllo: FITC CD4, APC-Cy7 CD3, 7AAD

- controllo di vitalità: FITC CD4, PE CD45RA, 7-AAD, PE-Cy7 CD127, APC CD25, APC-Cy7 CD3

Le sottopopolazioni dei linfociti T sono state così caratterizzate:

- CD3+: Linfociti T
- CD3+CD4+: Linfociti T helper
- CD3+CD4+CD25+: Linfociti T attivati, linfociti T memoria e Treg
- CD3+CD4+CD25+FOXP3+: Linfociti Treg
- CD3+CD4+CD25+FOXP3+CD45RA+: Linfociti Treg Naive
- CD3+CD4+CD25+CD127+: Linfociti Tconv

Inoltre la negatività per il 7AAD identifica la popolazione delle cellule vitali.

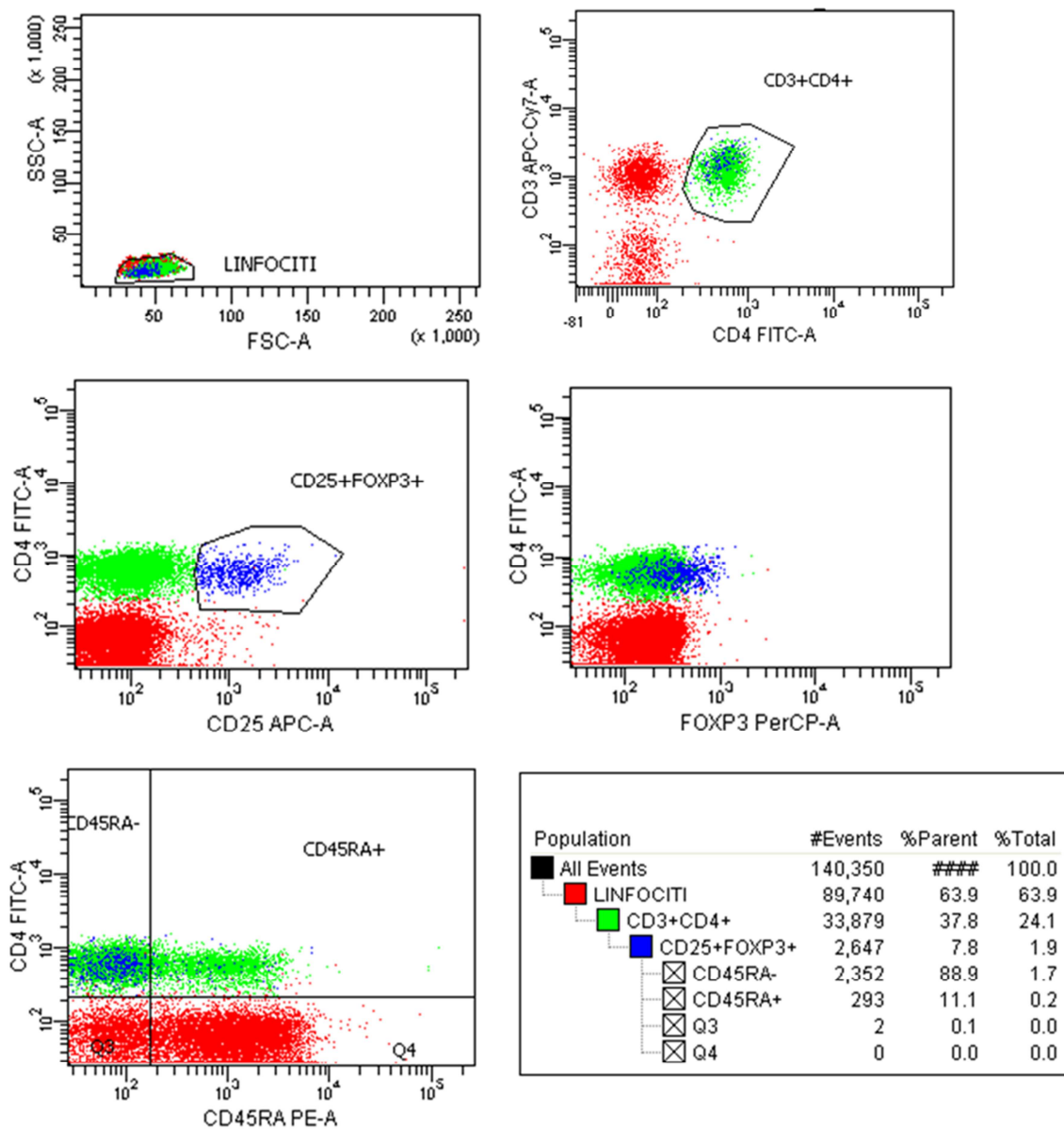


Figura 4. Strategia di *gating* per studiare i linfociti Treg

4 Studio del ciclo cellulare

Una parte delle cellule CD3+ trattate con i TKI per 96 ore, è stata fissata con etanolo 70% e mancata con Ioduro di Propidio (PI) per lo studio del ciclo cellulare.

Le cellule sono state pellettate tramite centrifugazione a 1800 rpm per 10 minuti, è stato eliminato tutto il surnatante e sono state fissate aggiungendo goccia a goccia, in agitazione, l'etanolo al 70% freddo (-20°C).

Dopo almeno 48 ore a 4°C, il pellet è stato recuperato e lavato con PBS tramite 2 centrifugazioni a 200 rpm per 5 minuti. Ad ogni campione di pellet asciutto sono stati poi aggiunti 200 µl di Ioduro di Propidio e 1 µl di RNasi; dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente al buio le cellule sono state lette in citofluorimetria (*BD FacsCantoll*) acquisendo almeno 100.000 eventi.

5 Analisi delle citochine secrete

I surnatanti delle colture cellulari sono stati raccolti e congelati a -20°.

L'analisi delle citochine presenti nei surnatanti delle colture cellulari è stata effettuata mediante *Bio-Plex* (*Bio-Rad*) utilizzando il kit *Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay* (*Bio-Rad*).

Sono state quantificate le seguenti citochine: interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, *Interferon-γ* (IFN-γ), *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α).

Analisi dei dati

Essendo entrambi dei protocolli di tipo biologico esplorativo, conoscitivo, non interventistico, non farmacologico è stata effettuata un'analisi descrittiva dei dati.

I dati sono stati presentati come media ± deviazioni standard (SD) ed analizzati con *Student's t-test*. Le differenze tra i campioni sono state considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

I. Caratterizzazione fenotipica, molecolare e funzionale dei fibroblasti di pazienti affetti da cGVHD e valutazione dell'attività degli inibitori delle tirosin-chinasi sui meccanismi molecolari di fibrosi

I fibroblasti provenienti da 6 campioni di cute di pazienti con cGVHD sono stati fatti aderire ad una fiasca; le cellule sono cresciute fino ad arrivare a confluenza e sono state staccate e riseminate in altre piastre in una *split ratio* conseguente alle necessità sperimentali.

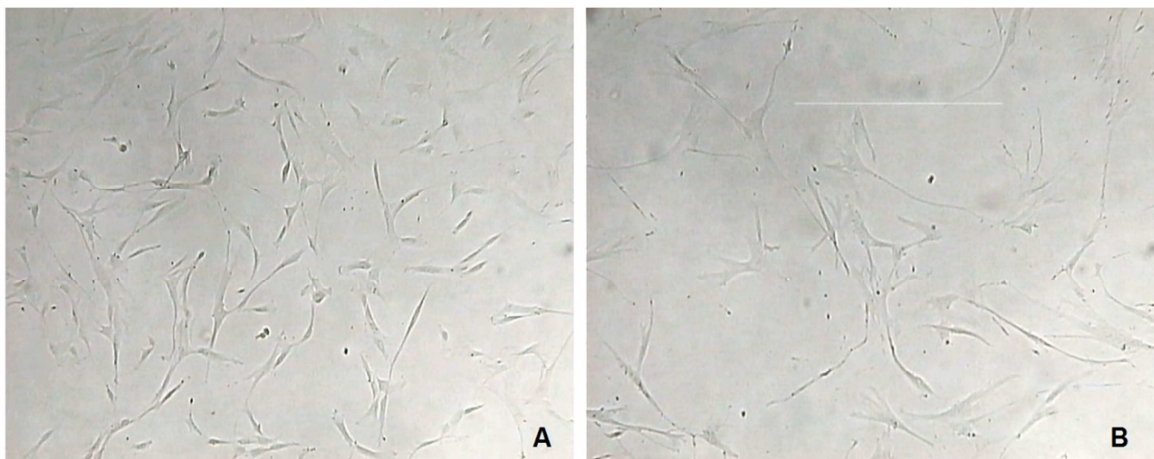


Figura 5. Espansione in vitro di fibroblasti sani (n-Fbs) [A] e di cute di paziente con GVHD (GVHD-Fbs) [B]

Le cellule in coltura liquida aderiscono alla superficie della fiasca assumendo una morfologia affusolata ed allungata e si espandono fino alla confluenza formando un monostrato cellulare (Figura 5).

I fibroblasti sani provenienti da linea cellulare [A] sono apparsi morfologicamente indistinguibili dai fibroblasti provenienti dalle biopsie di cute dei pazienti con cGVHD [B], sia per dimensioni che per aspetto. Ciò è valido dal primo passaggio fino alla senescenza cellulare.

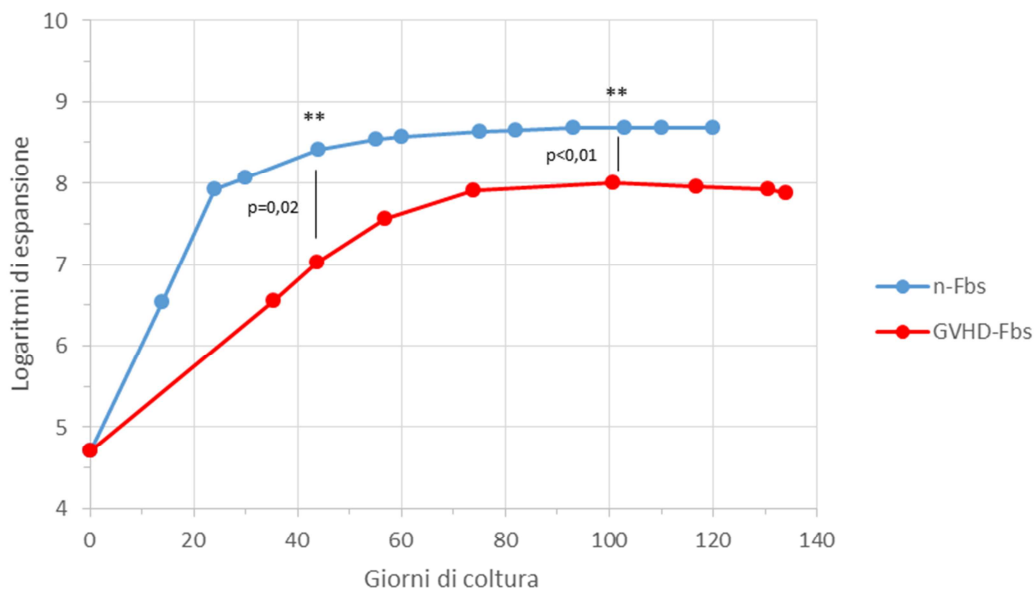


Figura 6. Curva di crescita dei fibroblasti sani e dei fibroblasti dei pazienti con cGVHD in coltura. L'espansione in logaritmi è calcolata come valore medio di sei campioni in relazione al tempo medio espresso in giorni. Ciascun punto rappresenta un passaggio di espansione della coltura.

La crescita dei fibroblasti sani (n-Fbs) è stata in media pari a 3,36 logaritmi dopo 4 passaggi, in 44 giorni; la crescita dei fibroblasti con cGVHD (GVHD-Fbs), invece, ha mostrato una crescita media di 2,86 logaritmi dopo 4 passaggi, in 57 giorni.

Dopo 44 giorni in coltura i GVHD-Fbs mostrano una differenza nella crescita cellulare statisticamente significativa ($p=0.02$) rispetto ai n-Fbs; dopo 100 giorni di coltura la differenza nella crescita è ancor più significativa ($p<0.01$).

I fibroblasti sani raggiungono la senescenza cellulare dopo 10 passaggi in 120 giorni, mentre per i fibroblasti patologici questo traguardo viene raggiunto dopo in media 8 passaggi (range 7-9) in 134 giorni.

2 Analisi immunofenotipica

I fibroblasti di tutti i campioni a diversi passaggi di coltura sono stati studiati in citofluorimetria per l'espressione di antigeni di superficie specifici per la linea cellulare.

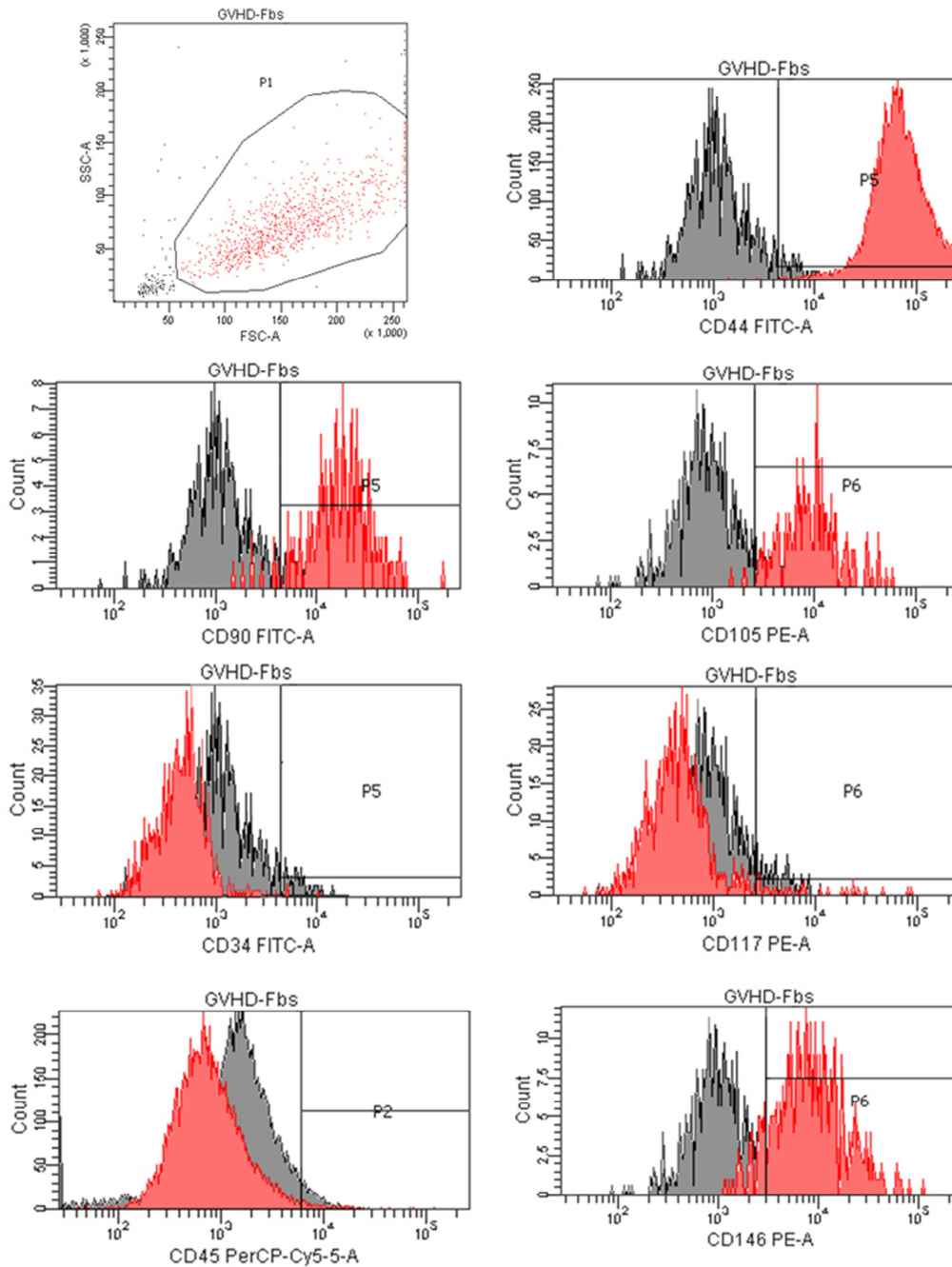


Figura 7. Analisi dei marcatori di superficie dei GVHD-Fbs in coltura. L'istogramma grigio indica il controllo negativo. I risultati sono rappresentativi di un campione di GVHD-Fbs al terzo passaggio

Durante l'espansione, le cellule studiate sono negative per gli antigeni di superficie emopoietici CD45, CD34, e CD117, mentre esprimono gli antigeni CD90, CD105, CD146 e CD44, tipici marcatori di superficie dei fibroblasti.

3 Capacità di differenziazione multilineare dei fibroblasti da cute con cGVHD

3.1 Differenziazione adipogenica

Per la differenziazione dei fibroblasti in adipociti è stato utilizzato il terreno *NH AdipoDiff*: dopo 21 giorni di coltura le cellule sono state colorate tramite *Oil Red O*, colorante lipofilo rosso. Gli adipociti appaiono al microscopio ottico come cellule rotondeggianti con accumuli lipidici di colore arancio-rosso.

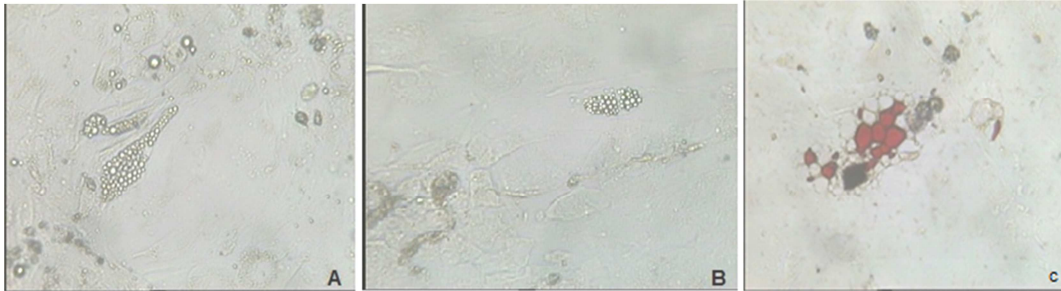


Figura 8. Capacità di differenziazione dei fibroblasti in adipociti.

[A] GVHD-Fbs; [B] n-Fbs; [C] Si notano i vacuoli lipidici intracellulari colorazione Oil Red O

Sono stati allestiti 3 esperimenti per valutare la capacità di differenziazione in adipociti dei fibroblasti sani e patologici, al secondo passaggio di espansione; entrambi, sono stati in grado di differenziare in senso adipogenico, formando piccole colonie o singoli adipociti, che risultano positivi alla colorazione con *Oil Red O*.

3.2 Differenziazione osteogenica

Il terreno di coltura utilizzato per promuovere la differenziazione dei fibroblasti in osteociti è il *NH OsteoDiff*: al decimo giorno di coltura è stata eseguita la colorazione *Von Kossa*: con questa colorazione i depositi di calcio sostituiti da quelli d'argento vengono facilmente evidenziati in nero.

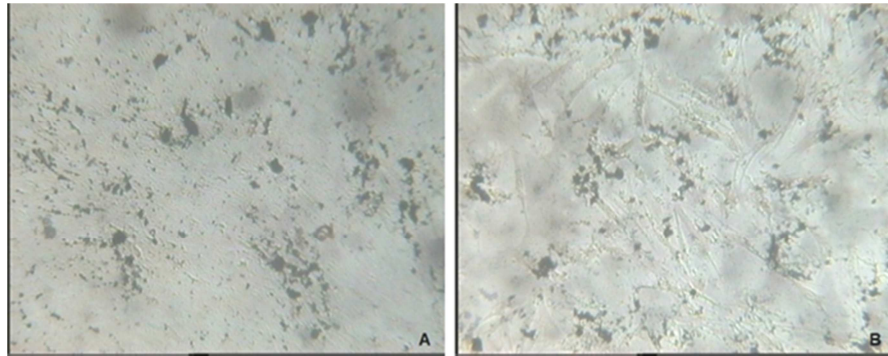


Figura 9. Capacità di differenziazione dei fibroblasti in osteociti; colorazione Von Kossa;
[A] GVHD-Fbs [B] n-Fbs

Sono stati allestiti 3 esperimenti per valutare la capacità di differenziazione in osteoblasti dei fibroblasti sani e patologici, al secondo passaggio di espansione; entrambi, sono stati in grado di differenziare in senso osteogenico, formando accumuli di calcio, rilevati con la specifica colorazione di *Von Kossa*.

3.3 Differenziazione condrogenica

Il terreno di coltura utilizzato per promuovere la differenziazione dei fibroblasti in condrociti è il *NH ChondroDiff*: al ventiquattresimo giorno di coltura il pellet è stato incluso in paraffina, tagliato al microtomo e le sezioni, poste su un vetrino, sono state colorate con *Alcian Blu*.

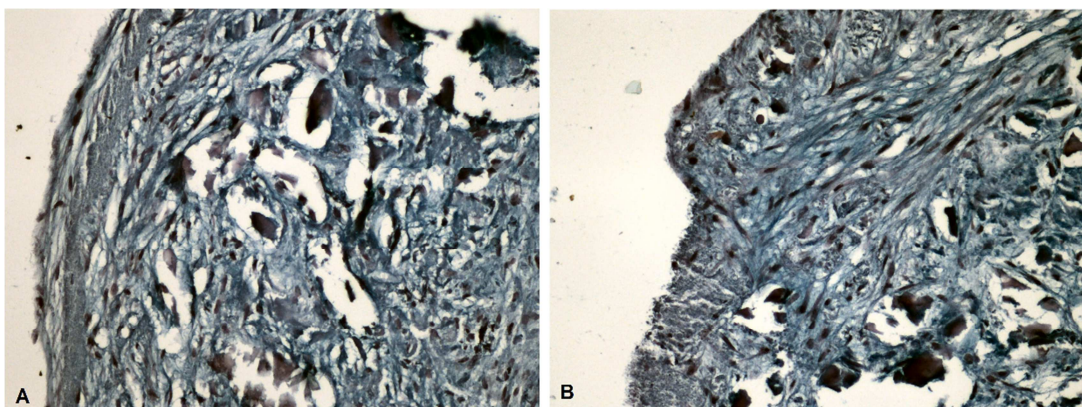


Figura 10. Capacità di differenziazione dei fibroblasti in condrociti; colorazione *Alcian Blu*
[A] GVHD-Fbs [B] n-Fbs

Sono stati allestiti 3 esperimenti per valutare la capacità di differenziazione in condrociti dei fibroblasti sani e patologici, al secondo passaggio di coltura; entrambi, sono stati in grado di differenziare in condrociti, formando matrice extracellulare glicoproteica, evidenziata dalla colorazione *Alcian Blu*.

4 Analisi dell'espressione basale dei geni del collagene in RT-PCR

In condizioni di *starvation* (0,2% FBS), dai fibroblasti normali e patologici in coltura allo stesso passaggio, è stato estratto e retrotrascritto l'mRNA totale ed i cDNA così ottenuti sono stati analizzati in *Real-Time PCR*. Sono stati studiati i geni COL1 α 1, COL1 α 2 e, come gene di controllo, è stato usato il GAPDH.

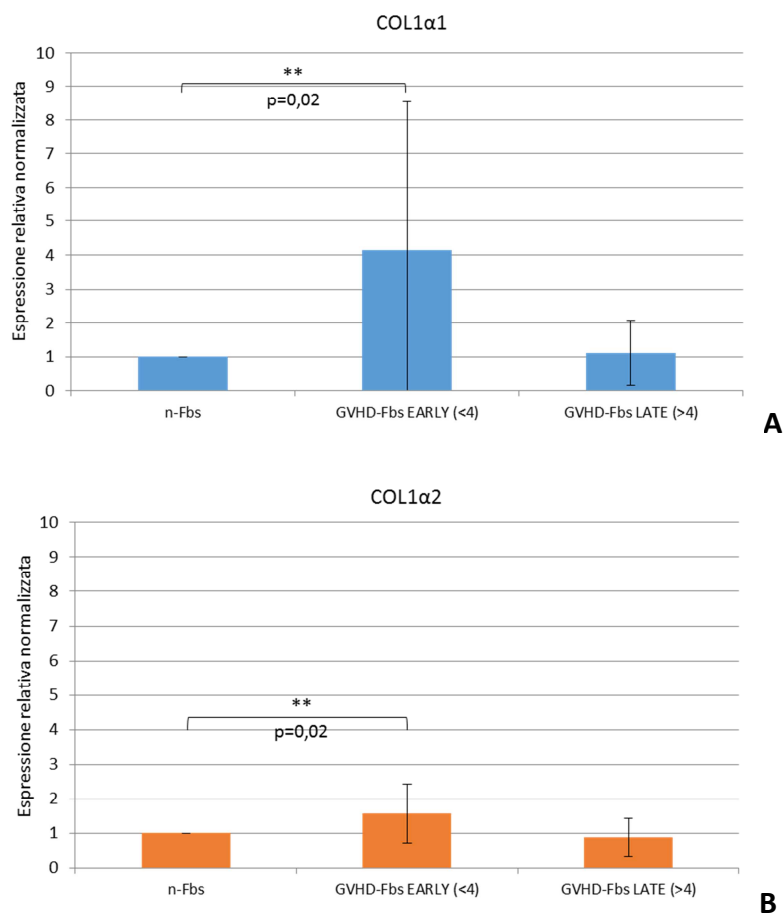


Figura 11. Espressione relativa normalizzata dell'mRNA delle catene del collagene COL1 α 1 (A) e COL1 α 2 (B) analizzata mediante *Real-Time PCR* nei fibroblasti sani (n-Fbs) e patologici (GVHD-Fbs)

La differenza di espressione del collagene nei fibroblasti sani e in quelli con GVHD è statisticamente significativa ($p=0,02$) nei primi 4 passaggi di coltura: i fibroblasti patologici (GVHD-Fbs EARLY) presentano un valore di espressione della catena COL1 α 1 incrementato di 4,14 volte rispetto ai fibroblasti sani; il valore di espressione della catena COL1 α 2 invece è incrementato di 1,57 volte rispetto ai fibroblasti sani.

La differenza di espressione del collagene nei fibroblasti sani e in quelli con GVHD non è statisticamente significativa all'aumentare del numero di passaggi di coltura (dal quinto passaggio in poi; GVHD-Fbs LATE).

5 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo stimolazione con TGF β

I fibroblasti normali e patologici, in condizioni di *starvation*, sono stati incubati con la citochina fibrosante TGF β alla concentrazione di 10ng/ml (0,04 nM) allo scopo di verificarne la capacità stimolatoria tramite la successiva analisi di espressione genica mediante *Real-Time PCR* dopo 48 ore.

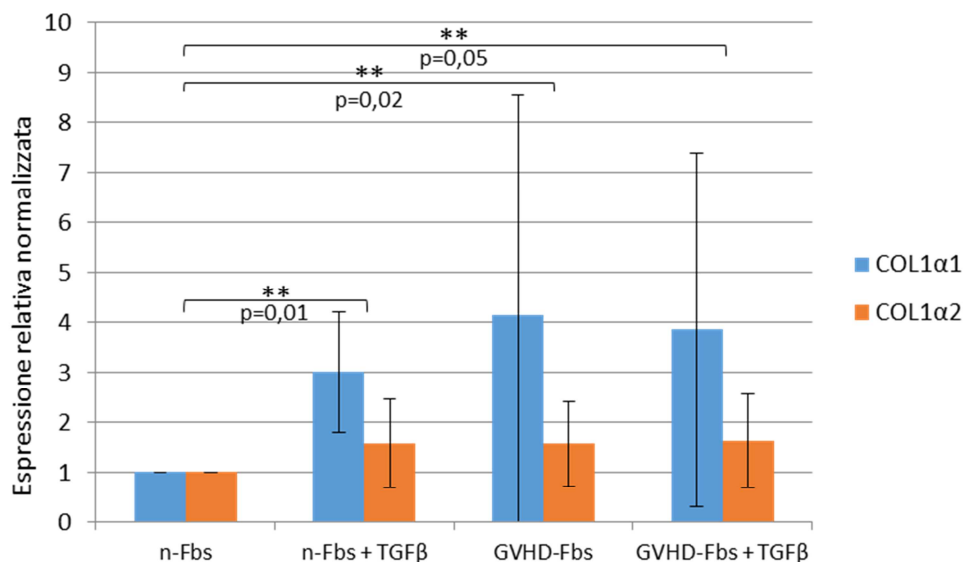


Figura 12. Espressione relativa normalizzata dell'mRNA delle catene del collagene COL1 α 1 e COL1 α 2 analizzata mediante *Real-Time PCR* nei fibroblasti sani (n-Fbs) e patologici (GVHD-Fbs) non stimolati o stimolati con 10ng/ml di TGF β

La differenza di espressione del collagene nei fibroblasti sani non stimolati e in quelli stimolati con TGF β è risultata statisticamente significativa ($p=0,02$): i fibroblasti stimolati presentano un valore di espressione della catena COL1 α 1 incrementato di 3 volte rispetto al basale; il valore di espressione della catena COL1 α 2 invece è incrementato di 1,58 volte rispetto al basale.

Non vi è differenza statisticamente significativa tra fibroblasti patologici non stimolati con TGF β e stimolati; inoltre non vi è differenza statisticamente significativa tra fibroblasti sani stimolati con TGF β e patologici stimolati e non stimolati.

6 Analisi dell'espressione dei geni del collagene in RT-PCR dopo incubazione con Nilotinib

In condizioni di starvation, i fibroblasti dei pazienti con cGVHD sono stati coltivati in presenza di Nilotinib (1 μ M) o di un inibitore del recettore del TGF β (SB431542; 10 μ M) e successivamente è stata verificata la capacità inibitoria studiando l'espressione dei geni del collagene mediante *Real-Time PCR*.

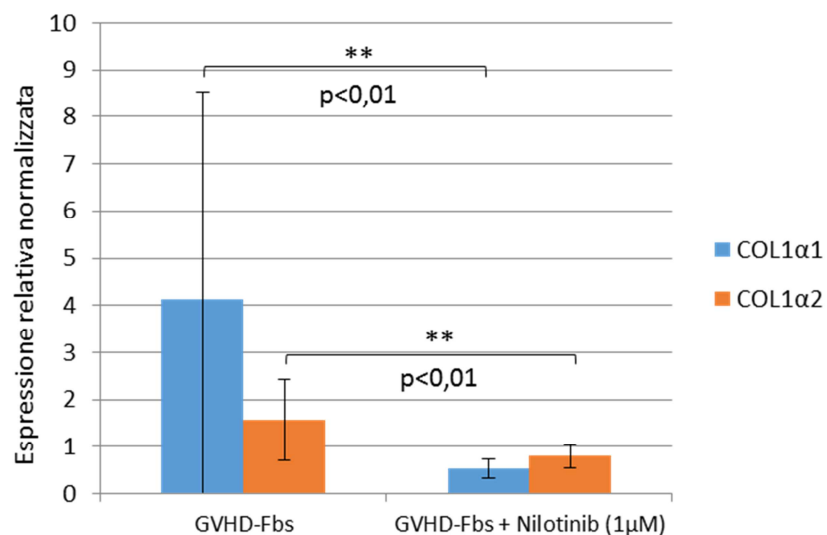


Figura 13. Espressione relativa normalizzata dell'mRNA delle catene del collagene COL1 α 1 e COL1 α 2 analizzata mediante *Real-Time PCR* nei fibroblasti patologici (GVHD-Fbs) in assenza ed in presenza di Nilotinib (1 μ M)

La differenza di espressione del collagene nei fibroblasti patologici in assenza ed in presenza di Nilotinib (1 μ M) è statisticamente significativa ($p < 0,01$): i fibroblasti patologici in presenza del farmaco riducono la produzione di COL1 α 1 e di COL1 α 2 rispettivamente del 86,5% e del 49%.

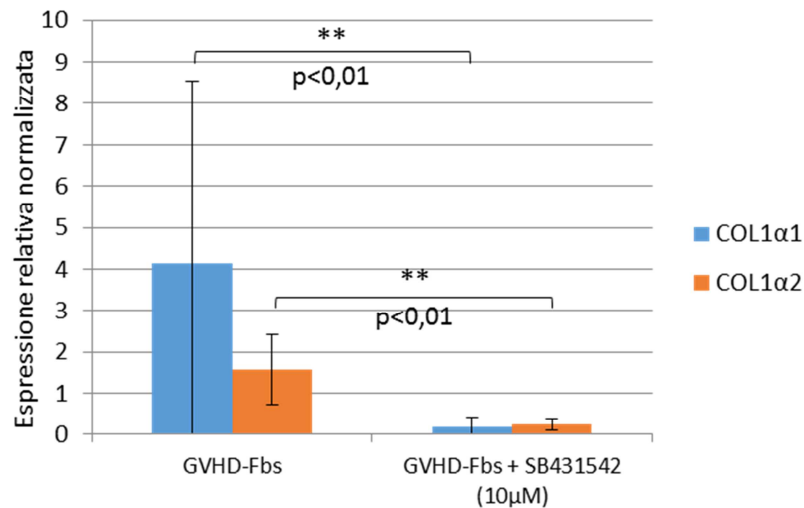


Figura 14. Espressione relativa normalizzata dell'mRNA delle catene del collagene COL1 α 1 e COL1 α 2 analizzata mediante *Real-Time PCR* nei fibroblasti patologici (GVHD-Fbs) in assenza ed in presenza di SB431542 (10 μ M)

La differenza di espressione del collagene nei fibroblasti patologici in assenza ed in presenza di SB432542 (1 μ M) è statisticamente significativa ($p < 0,01$): i fibroblasti patologici in presenza dell'inibitore riducono la produzione di COL1 α 1 e di COL1 α 2 rispettivamente del 95,4% e del 84%.

II. Studio in vitro dell'effetto immunomodulante degli inibitori delle tirosin-chinasi sulle cellule immunocompetenti

I linfociti separati o le PBMC, sono stati coltivati con diverse concentrazioni di Nilotinib, di Dasatinib, Imatinib o Ponatinib in assenza o presenza di PHA.

Le cellule ottenute da queste colture sono state poi analizzate al citofluorimetro marcandole per lo studio delle seguenti popolazioni linfocitarie: linfociti T con particolare attenzione alla sottopopolazione dei Treg, linfociti B e cellule NK.

1 IMATINIB

Le colture sono state eseguite in assenza o in presenza di PHA e con diverse concentrazioni di Imatinib (1 μ M, 10 μ M e 50 μ M).

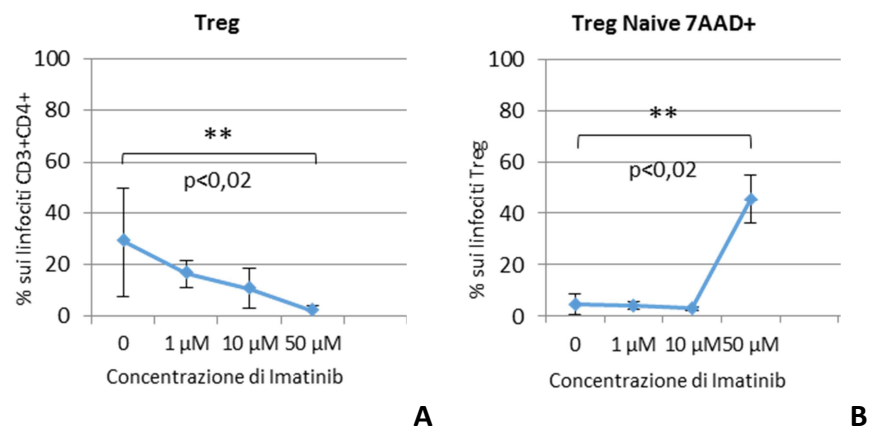


Figura 15. A-Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione Treg a diverse concentrazioni di Imatinib: la percentuale dei Treg è stata calcolata sui linfociti T (CD3+CD4+) mediante l'espressione simultanea dei marcatori CD25 e FOXP3

B- Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione Treg Naive a diverse concentrazioni di Imatinib: la percentuale dei Treg Naive è stata calcolata sui linfociti Treg mediante l'espressione del marcatore CD45RA

Si riscontra un aumento di mortalità statisticamente significativo ($p < 0,01$) dei linfociti T CD3+ a concentrazioni di Imatinib uguali o maggiori di 50 μ M.

Il farmaco determina diminuzione del numero dei linfociti Treg ($p < 0,02$) e la morte cellulare dei linfociti T reg Naive ($p < 0,02$) alla concentrazione di $50 \mu\text{M}$; in entrambi i casi la PHA non protegge le cellule dall'azione del farmaco, che si traduce in un aumento della mortalità cellulare statisticamente significativo ($p < 0,05$). Tutte le altre sottopopolazioni dei linfociti T rimangono non subiscono variazioni statisticamente rilevanti né del numero né della vitalità.

Si evidenzia un aumento di mortalità statisticamente significativo della popolazione dei linfociti T NK ($p < 0,01$) a tutte le concentrazioni del farmaco, delle cellule NK ($p < 0,03$) a partire da $10 \mu\text{M}$ e dei linfociti T citotossici ($p < 0,01$) alla massima concentrazione di Imatinib ($50 \mu\text{M}$); stesso fenomeno si verifica in presenza di PHA.

2 NILOTINIB

Le colture sono state eseguite in assenza o in presenza di PHA e con diverse concentrazioni di Nilotinib ($0,5 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$).

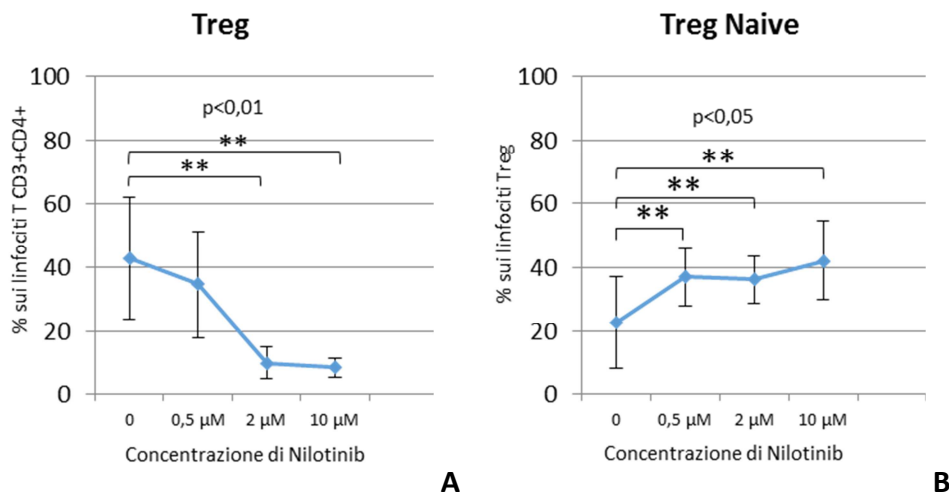


Figura 16. A-Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione Treg a diverse concentrazioni di Nilotinib: la percentuale dei Treg è stata calcolata sui linfociti T (CD3+CD4+) mediante l'espressione simultanea dei marcatori CD25 e FOXP3

B- Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione Treg Naive a diverse concentrazioni di Nilotinib: la percentuale dei Treg Naive è stata calcolata sui linfociti Treg mediante l'espressione del marcatore CD45RA

Tutte le sottopopolazioni dei linfociti T rimangono stabili sia per numero che per vitalità; il Nilotinib mostra un'azione selettiva sui Treg ($p < 0,01$) a concentrazioni uguali o superiori a $2 \mu\text{M}$, e sui Treg Naive a tutte le concentrazioni ($p < 0,05$); non si riscontrano variazioni statisticamente significative di queste 2 popolazioni in presenza di PHA.

La diminuzione del numero delle cellule non si traduce in un aumento di mortalità ma in un blocco del ciclo cellulare: tramite la marcatura con lo ioduro di propidio della popolazione dei linfociti T ($\text{CD}3^+$) si evidenzia un aumento statisticamente significativo del numero di cellule in fase G1 ($p < 0,01$) e, conseguentemente, una diminuzione del numero di cellule in fase S e G2 ($p < 0,05$).

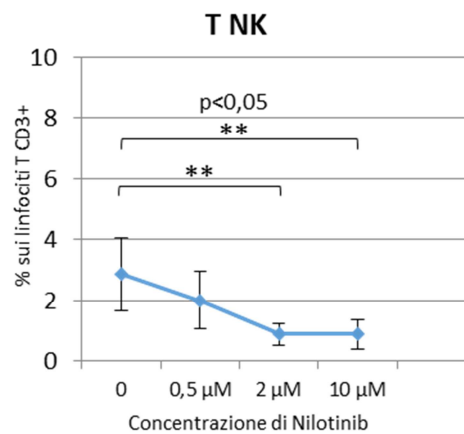


Figura 17. Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione T NK a diverse concentrazioni di Nilotinib: la percentuale dei T NK è stata calcolata sui linfociti T ($\text{CD}3^+$) mediante l'espressione simultanea dei marcatori $\text{CD}16$ e $\text{CD}46$

Le popolazioni dei linfociti T e B non subiscono variazioni nel numero e nella vitalità cellulare nemmeno alla massima concentrazione di Nilotinib ($10 \mu\text{M}$). Le uniche popolazioni che subiscono una riduzione statisticamente significativa del numero e nella vitalità cellulare sono i linfociti T NK ($p < 0,05$; $p < 0,02$) e le cellule NK stimulate con la PHA ($p < 0,01$; $p < 0,02$).

3 DASATINIB

Le colture sono state eseguite in assenza o in presenza di PHA e con diverse concentrazioni di Dasatinib (50 nM, 100 nM e 200 nM).

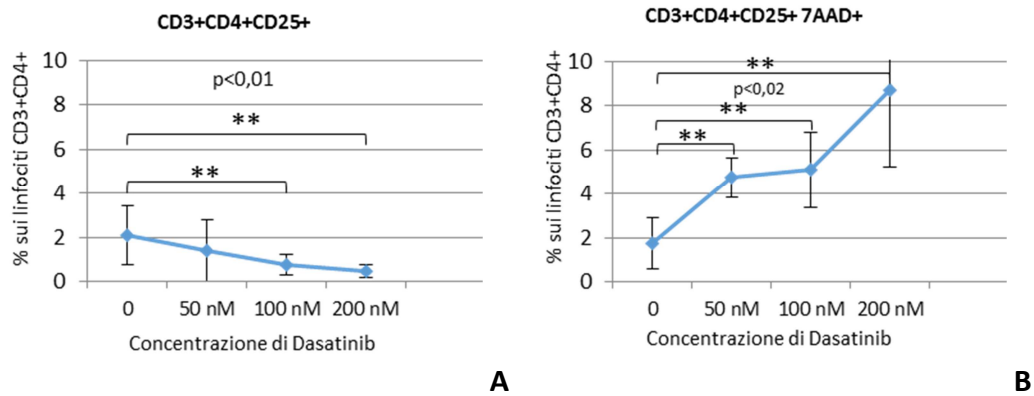


Figura 18. A-Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione T CD25+ a diverse concentrazioni di Dasatinib: la percentuale dei T CD25+ è stata calcolata sui linfociti T (CD3+CD4+) mediante l'espressione del marcatore CD25

B- Variazione percentuale della vitalità della popolazione T CD25+ a diverse concentrazioni di Dasatinib: la percentuale dei T CD25+ morti è stata calcolata sui linfociti T (CD3+CD4+) mediante l'espressione simultanea dei marcatori CD25 e 7AAD

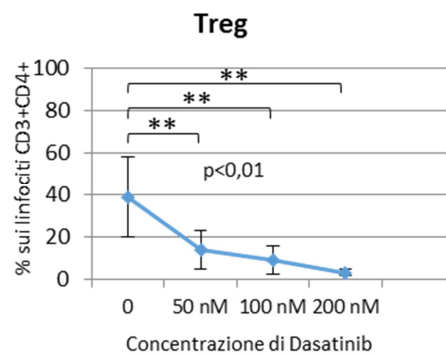


Figura 19. Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione Treg a diverse concentrazioni di Dasatinib: la percentuale dei Treg è stata calcolata sui linfociti T (CD3+CD4+) mediante l'espressione simultanea dei marcatori CD25 e FOXP3

Si riscontra un aumento di mortalità statisticamente significativa ($p < 0,05$) dei linfociti T a concentrazioni di Dasatinib uguali o maggiori di 100nM.

Tutte le sottopopolazioni dei linfociti T rimangono stabili sia per numero che per vitalità; il Dasatinib determina un aumento di mortalità statisticamente significativa dei linfociti T CD25+ ($p < 0,02$) e una diminuzione del numero dei Treg ($p < 0,01$) a tutte le concentrazioni; questo fenomeno si verifica in presenza di PHA. Nell'ambito dei linfociti Treg Naive si riscontra un aumento della mortalità cellulare statisticamente significativo ($p < 0,01$) a partire dalla concentrazione più bassa di Dasatinib (50nM); si rileva un aumento di mortalità di questa popolazione anche in presenza di PHA ($p < 0,05$). Si evidenzia un aumento di mortalità statisticamente significativo dei linfociti T CD3+ ($p < 0,02$) a partire da una concentrazione di 100 nM di Dasatinib; i linfociti B ($p < 0,03$) e le cellule NK ($p < 0,01$) mostrano un aumento di mortalità a partire dalla concentrazione più bassa di Dasatinib (50 nM) anche in presenza di PHA.

4 PONATINIB

Le colture sono state eseguite in assenza o in presenza di PHA e con diverse concentrazioni di Ponatinib (1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM).

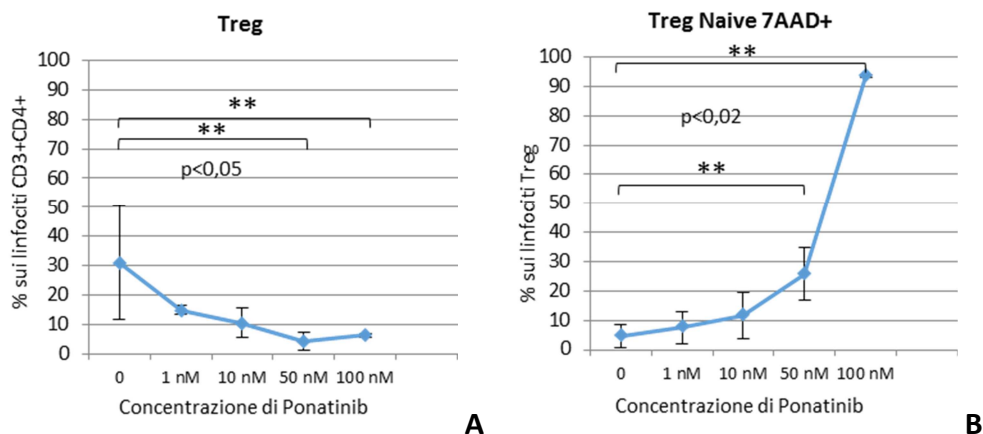


Figura 20. **A-**Variazione percentuale del numero di cellule della popolazione Treg a diverse concentrazioni di Ponatinib: la percentuale dei Treg è stata calcolata sui linfociti T (CD3+CD4+) mediante l'espressione simultanea dei marcatori CD25 e FOXP3
B- Variazione percentuale della mortalità delle cellule della popolazione Treg Naive a diverse concentrazioni di Ponatinib: la percentuale dei Treg Naive morta è stata calcolata sui linfociti Treg mediante l'espressione simultanea dei marcatori CD45RA e 7AAD

Si riscontra un aumento di mortalità statisticamente significativo ($p < 0,01$) dei linfociti T CD3+ a concentrazioni di Ponatinib uguali o maggiori di 50 nM.

Tutte le sottopopolazioni dei linfociti T rimangono stabili sia per numero che per vitalità; il farmaco determina una significativa diminuzione del numero delle cellule Treg ($p < 0,05$) e l'aumento di mortalità dei Treg Naive ($p < 0,02$) alla concentrazione di 50 nM; stessi risultati si ottengono in presenza di PHA.

L'aumento di mortalità delle popolazioni dei linfociti T totali ($p < 0,01$), T NK ($p < 0,01$), dei linfociti B ($p < 0,01$) e delle cellule NK ($p < 0,05$) raggiunge la significatività solo ad una concentrazione di 50 nM di Ponatinib.

	Dose Farmaco	Linfociti totali	Linfociti T Helper	Linfociti Treg	Linfociti Treg Naive	Linfociti T Citotossici	Linfociti T NK	Cellule NK	Linfociti B
basale	0	68,4	49,5	35,5	21,8	28,3	2,9	7,2	9,1
IMATINIB	1 µM	53,1	51,5	16,4	43,8	24,9	2,8	6,2	7,4
	10 µM	49,0	54,6	10,8	37,9	24,1	2,4	6,1	5,7
	50 µM	41,7	53,0	2,2	31,3	23,8	0,7	2,5	4,6
NIOLOTINIB	0,5 µM	70,9	50,3	34,6	37,0	28,9	2,0	6,6	8,7
	2 µM	66,1	52,8	10,0	36,3	29,5	0,9	5,8	8,5
	10 µM	62,5	52,0	8,4	42,1	28,4	0,9	5,5	8,6
DASATINIB	50 nM	46,4	52,9	14,2	21,3	25,7	3,2	3,2	3,4
	100 nM	30,5	32,3	9,2	26,7	16,0	3,4	2,4	3,5
	200 nM	30,5	nv	3,5	33,1	nv	nv	nv	nv
PONATINIB	1 nM	53,6	49,1	14,9	49,6	28,0	3,6	7,9	5,8
	10 nM	46,0	49,7	10,5	33,2	29,6	2,8	5,0	3,5
	50 nM	36,8	68,0	4,3	52,0	23,8	0,3	1,9	1,7

Tabella 8. Tabella riassuntiva che indica la variazione percentuale del numero di cellule di tutte le popolazioni linfocitarie alle diverse concentrazioni dei farmaci TKI

	Dose Farmaco	Linfociti totali	Linfociti T Helper	Linfociti CD25+	Linfociti Treg Naive	Linfociti T Citotossici	Linfociti T NK	Cellule NK	Linfociti B
basale	0	0,3	0,1	1,9	6,7	0,1	8,2	0,7	0,0
IMATINIB	1 µM	0,8	0,3	2,5	4,1	0,3	15,2	0,9	0,0
	10 µM	0,9	0,4	2,7	2,9	0,4	22,3	1,3	0,0
	50 µM	1,8	0,6	48,8	45,4	0,7	27,1	3,5	0,1
NIOLOTINIB	0,5 µM	0,4	0,1	2,0	21,1	0,2	8,4	1,0	0,0
	2 µM	0,7	0,2	10,5	21,2	0,3	10,0	1,0	0,1
	10 µM	0,6	0,2	22,7	33,9	0,4	11,7	1,0	0,1
DASATINIB	50 nM	0,9	0,7	4,7	35,1	0,5	12,3	1,5	0,3
	100 nM	3,5	2,1	5,1	34,9	0,9	50,1	3,1	0,8
	200 nM	100	100	8,7	30,1	100	100	100	100
PONATINIB	1 nM	1,1	0,2	4,4	7,5	0,4	13,6	0,5	0,1
	10 nM	1,2	0,3	7,5	11,5	0,4	16,9	2,2	0,1
	50 nM	1,9	1,1	11,3	25,8	2,0	30,6	22,5	2,7

Tabella 9. Tabella riassuntiva che indica la variazione percentuale della mortalità di tutte le popolazioni linfocitarie alle diverse concentrazioni dei farmaci TKI

5 Analisi delle citochine secrete

Sono state quantificate le citochine IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ e TNF- α presenti nei surnatanti delle colture cellulari mediante *Bio-Plex ELISA*.

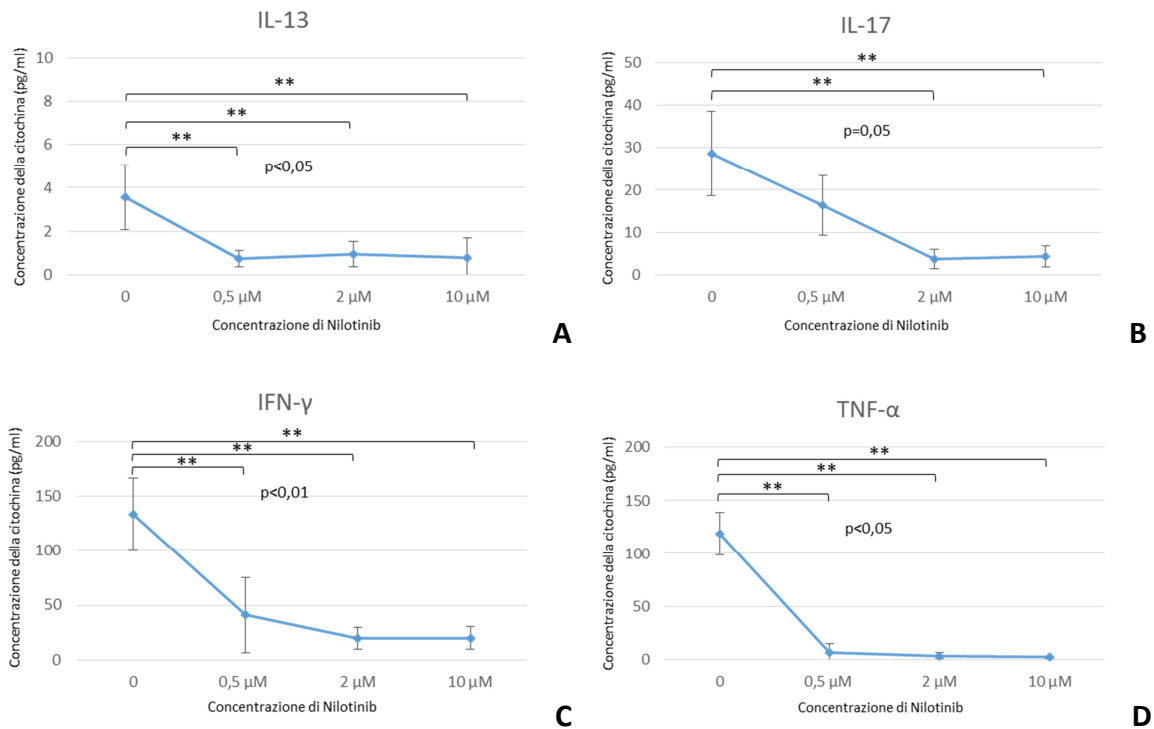


Figura 21 A- Variazione della concentrazione di IL-13 (pg/ml) nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Nilotinib

B- Variazione della concentrazione di IL-17 (pg/ml) nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Nilotinib

C- Variazione della concentrazione di IFN- γ (pg/ml) nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Nilotinib

D- Variazione della concentrazione di TNF- α (pg/ml) nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Nilotinib

Si evidenzia una diminuzione statisticamente significativa dell'interferone γ ($p < 0,05$) a tutte le concentrazioni di Nilotinib; alle stesse concentrazioni del farmaco diminuiscono significativamente anche il TNF- α ($p < 0,05$) e l'interleuchina 13 ($p < 0,05$). L'interleuchina 17 invece diminuisce in maniera statisticamente significativa ($p < 0,05$) solo a concentrazioni

del farmaco uguali o maggiori a 2 μ M. Questo fenomeno non si verifica in presenza di PHA.

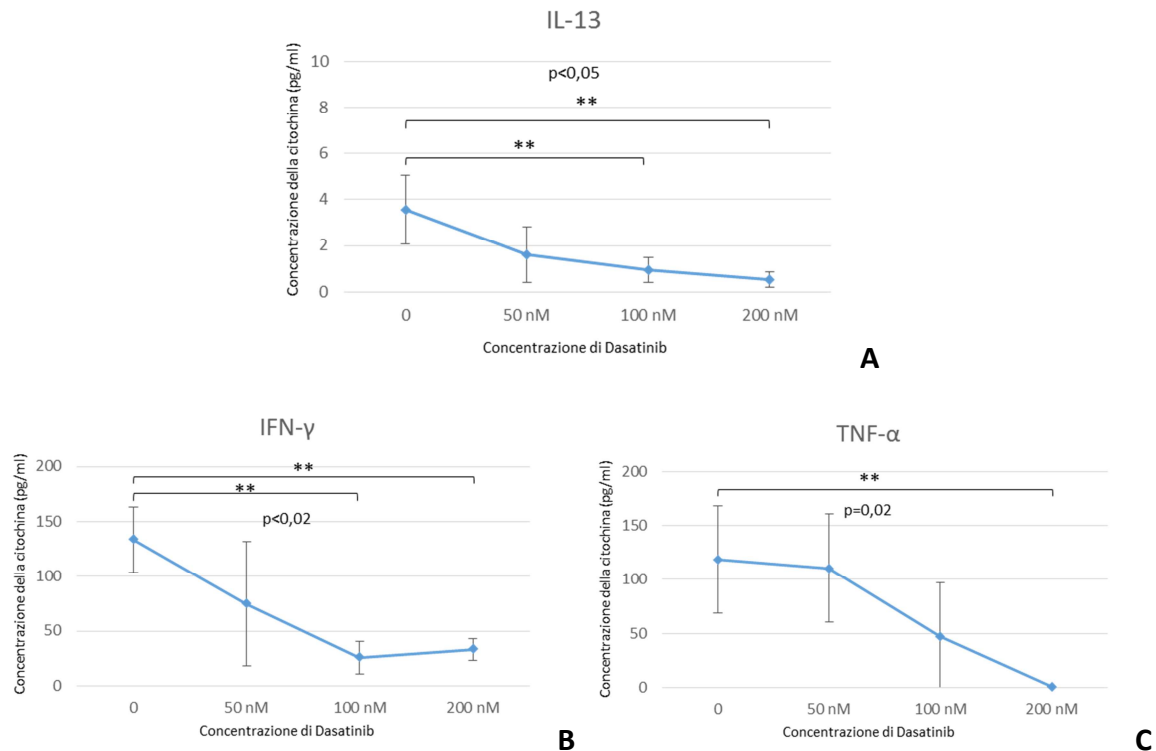


Figura 22 A- Variazione della concentrazione di IL-13 (pg/ml) nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Dasatinib

B- Variazione della concentrazione di IFN- γ (pg/ml) nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Dasatinib

C- Variazione della concentrazione di TNF- α (pg/ml) nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Dasatinib

Si evidenzia una diminuzione statisticamente significativa dell'interleuchina 13 ($p < 0,05$) a concentrazioni di Dasatinib uguali o maggiori a 100nM; alle stesse concentrazioni di farmaco diminuisce significativamente anche l'interferone γ ($p < 0,02$). Il TNF- α invece diminuisce in maniera statisticamente significativa ($p = 0,02$) solo a concentrazioni del farmaco uguali o maggiori a 200nM. Questo fenomeno non si verifica in presenza di PHA.

Non è stata evidenziata alcuna variazione statisticamente significativa della concentrazione di citochine nei surnatanti delle colture di PBMC sottoposte a diverse concentrazioni di Imatinib e Ponatinib.

DISCUSSIONE

La *chronic Graft-Versus-Host Disease* è la causa principale di mortalità tardiva in soggetti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali. La cGVHD si presenta con quadri clinici proteiformi, che ricordano molte patologie autoimmuni. Una delle tipologie clinico-patologiche più frequenti di cGVHD è la “cGVHD *scleroderma-like*”, caratterizzata da lesioni del derma (e più raramente di altri organi) molto simili a quelle presenti nella Sclerodermia Sistemica.

Sulla base di questo *background* abbiamo focalizzato due aspetti significativi della patogenesi della cGVHD: I- la caratterizzazione dei fibroblasti della cute patologica (GVHD-Fbs); II- l'effetto biologico dopo incubazione con inibitori delle tirosin-chinasi (TKI) sugli stessi e sulle cellule immunocompetenti.

I dati disponibili in letteratura riguardo le caratteristiche dei GVHD-Fbs umani in vitro sono scarsi. I GVHD-Fbs sono morfologicamente indistinguibili dai fibroblasti normali in coltura, sia per dimensione che per aspetto, dal primo passaggio fino alla senescenza cellulare. Se valutiamo la capacità di propagazione in vitro, è evidente che i GVHD-Fbs crescono più lentamente e raggiungono la senescenza cellulare dopo un minor numero di passaggi.

Durante gli esperimenti, inoltre abbiamo osservato una variabilità di capacità proliferativa e di espressione del collagene tra i diversi campioni di GVHD-Fbs analizzati, probabilmente dovuta al fatto che le cellule studiate provengono da pazienti trattati con terapie diverse.

Un gruppo di ricerca tedesco ha dimostrato che i fibroblasti provenienti da cute normale mostrano immunofenotipo e potenziale di differenziamento caratteristici delle cellule staminali. [109] Confrontando l'immunofenotipo dei GVHD-Fbs con i n-Fbs, si è visto che questi mostrano identica espressione dei principali marcatori di superficie, e quindi anche le stesse caratteristiche di staminalità, proprietà che viene mantenuta in tutti i passaggi di coltura cellulare. Come descritto dal lavoro di Katrin Lorenz e da altri gruppi di ricerca [110], oltre all'immunofenotipo è importante analizzare il potenziale di differenziazione: i fibroblasti patologici possiedono capacità di differenziazione multilineare verso la linea adipogenica, osteogenica e condrogenica, similmente ai fibroblasti normali. I meccanismi alla base del processo profibrotico nella SSc non sono stati ancora completamente

elucidati. Studi storici [111] hanno dimostrato che i fibroblasti di pazienti con SSc sono caratterizzati dalle seguenti alterazioni del metabolismo del collagene: aumentata produzione di collagene di tipo I e tipo III, ridotta degradazione del collagene e aumentata produzione di mRNA del pro-collagene tipo I catene alfa1 e alfa2. Gli stessi autori avevano mostrato che l'aumentata produzione di collagene è dimostrabile anche in un modello in vitro costituito da fibroblasti ottenuti da biopsie dermiche di pazienti con SSc [112]: tale proprietà tuttavia era transiente, in quanto l'aumentata produzione di collagene rispetto a controlli sani si manteneva soltanto per i primi passaggi in coltura e al quinto passaggio i livelli di collagene dei fibroblasti sclerodermici e normali erano pressoché uguali. I nostri dati confermano questo fenomeno: infatti l'analisi dell'espressione dei geni del collagene nei fibroblasti patologici, in condizioni di *starvation*, mostra che questi esprimono maggiormente COL1 α 1 e COL1 α 2 rispetto ai fibroblasti normali, dato confermato anche nel lavoro del gruppo di Gabrielli et al. [23]. Questo suggerisce che le cellule patologiche, allo stato basale, abbiano un'up-regolazione del *pathway* di espressione dei geni del collagene. Come nel caso delle cuti sclerodermiche [112], anche i GVHD-Fbs dopo il quinto passaggio di coltura normalizzano la produzione di collagene.

I fattori alla base del mantenimento di tale fenotipo fibrosico in vivo sono ancora oggetto di discussione. Alcune caratteristiche istologiche di alterazioni sclerotiche di cGVHD sono simili a quelle della SSc, ciò suggerisce che le due patologie presentano meccanismi fibrotici comuni. Prima della comparsa della fibrosi, in entrambe le patologie si assiste ad alterazioni del microcircolo, ad un'iperplasia della tonaca intima dei piccoli e grandi vasi e ad una proliferazione capillare focale nelle fasi precoci della cGVHD (contrariamente a quanto avviene nella SSc dove si assiste alla perdita dei marcatori endoteliali e dei capillari dermici). [113] Nella cGVHD i cambiamenti sclerotici della cute spesso sono preceduti da alterazioni epidermiche, ma alcuni pazienti sviluppano una diffusa sclerosi cutanea senza una apparente fase infiammatoria lichenoidale. È possibile diagnosticare una cGVHD mediante una biopsia cutanea quando il tessuto presenta una sclerosi del derma papillare o del derma reticolare, manifestazione legata al rilascio di citochine e all'infiammazione. Il rimodellamento tissutale progredisce con la perdita delle papille dermiche e la comparsa di una discreta fibrosi del derma papillare e avventiziale. Successivamente si assiste ad un ispessimento omogeneo del derma reticolare e

sottocutaneo con atrofia o scomparsa degli annessi cutanei. A questo livello l'immagine che si ottiene della biopsia risulta simile a quella osservata nel caso di sclerosi sistemica. Nelle fasi iniziali della cGVHD le modifiche sclerotiche possono essere associate alla comparsa di infiltrato plasmacellulare nella zona perivascolare e negli interstizi del derma reticolare, mentre nelle fasi avanzate della patologia si evidenzia una notevole infiammazione cutanea con comparsa di vacuoli nelle cellule dell'epidermide o apoptosi. La produzione di citochine fibrosanti indotta da cellule immunitarie di provenienza vascolare è stata considerata a lungo il principale meccanismo alla base della fibrosi nella SSc. A supporto di tale tesi nelle biopsie di cute di SSc è riscontrabile una co-localizzazione di cellule immunitarie, TGF β e mRNA del pro-collagene. [114]

Se stimolati con la TGF β , i n-Fbs incrementano di 3 volte la produzione di COL1 α 1 e di 1,58 volte la produzione di COL1 α 2 ($p=0,02$) mentre i GVHD-Fbs non mostrano variazioni significative nell'espressione dei geni del collagene, segno che queste cellule siano già in uno stato di massima attivazione.

Inoltre, stimolando con TGF β i GVHD-Fbs dopo il quinto passaggio in coltura, questi non mostrano un aumento della produzione di COL1 α 1 e COL1 α 2 (dati non mostrati), ciò potrebbe significare che queste cellule sono "esauste".

Studi sperimentali hanno dimostrato che somministrando anticorpi anti-TGF β si ottiene una riduzione della fibrosi cutanea e polmonare in modelli murini con cGVHD *sleroderma-like*. [25]

Utilizzando un potente inibitore del TGF β (SB431542) sui fibroblasti patologici si riscontra una riduzione statisticamente significativa ($p<0,01$) di COL1 α 1 e COL1 α 2 rispettivamente del 95,4% e del 84%; questo fenomeno conferma che il recettore per il TGF β è fortemente coinvolto nell'up-regolazione dei geni del collagene nei GVHD-Fbs.

A tal proposito, dati di letteratura confermano che bloccando il segnale TGF- β con un TKI si ha una riduzione della fibrosi. [99,100]

Passando agli effetti biologici dei TKI, sui bersagli principali (fibroblasti ed effettori immunologici), è importante ricordare che ormai queste molecole sono entrate nell'armamentario terapeutico del trapiantologo, dimostrando una notevole efficacia nei pazienti con cGVHD steroideo-refrattaria. [73, 115,116] Tuttavia, i meccanismi d'azione di queste molecole nella cGVHD rimangono ancora da elucidare.

Nel nostro studio abbiamo osservato che i GVHD-Fbs, in coltura con una concentrazione di Nilotinib terapeutica (1 μ M), riducono l'espressione di COL1 α 1 e di COL1 α 2 rispettivamente del 86,5% e del 49% (p<0,01). Questa osservazione conferma una serie di dati sperimentali che suggeriscono l'uso dei TKI ed in particolare di Nilotinib per bloccare il meccanismo di fibrosi alla base della cGVHD e di altre malattie con caratteristiche fibrosanti.

Saranno necessari ulteriori studi per verificare se l'aumento o la diminuzione della produzione dell'RNA del collagene in vitro, corrisponde o meno ad una variazione della rispettiva proteina.

Sia la SSc che la cGVHD sono patologie caratterizzate da autoimmunità e più in generale da complesse alterazioni del sistema immunitario. [117]

Studi recenti hanno dimostrato che nella Sclerodermia così come nella cGVHD scleroderma-like sono presenti anticorpi autoreattivi rivolti verso il PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor). [22-24] Il PDGFR è un recettore tirosin-chinasico, presente su diversi tipi cellulari, tra cui i fibroblasti e le cellule endoteliali; in alcune fasi può essere espresso anche da altri tipi cellulari emopoietici e non. L'interazione del PDGF con il suo recettore PDGFR determina un incremento dei ROS intracellulari i quali, a loro volta, sono alla base della aumentata sintesi del collagene; questo circuito è risultato perennemente attivato nei fibroblasti sclerodermici e di pazienti con cGVHD. Gli autoanticorpi anti-PDGFR avrebbero un ruolo determinante nell'innescare di tale processo, in quanto in grado di stimolare il pathway a valle in maniera analoga al PDGF.

Dati recenti in vitro mostrano che gli inibitori delle tirosin-chinasi, tra cui Imatinib e Nilotinib inibiscono entrambi i *pathways* intracellulari di PDGF e TGF β . Anche in questo caso gli studi in vitro sono stati condotti principalmente nel campo della SSc. [99,100]

La patofisiologia della cGVHD è il risultato di una complessa alterazione del sistema immunitario, tuttavia l'esatto meccanismo non è ancora noto. I linfociti T CD4+ e CD8+ sono considerati gli effettori principali nello sviluppo della cGVHD. Infatti, la deplezione delle cellule T al momento del trapianto elimina quasi completamente il rischio di sviluppo di cGVHD, al prezzo di una maggiore tendenza al rigetto del trapianto ed alla ricaduta della patologia di base a causa dell'assenza dell'effetto *Graft versus Leukemia*. [118].

Recenti studi hanno evidenziato anche l'importanza delle cellule B nello sviluppo della cGVHD: infatti la deplezione linfocitaria B ottenuta mediante la terapia con l'anticorpo monoclonale Rituximab determina una risposta clinica della cGVHD. [63]

Molti studi correlano la cGVHD ad un'alterata omeostasi delle cellule B. Infatti, la ricombinazione durante la sintesi delle immunoglobuline porta frequentemente all'emergenza di cloni autoreattivi, che l'organismo normalmente è in grado di controllare o eliminare. Nel corso dell'infiammazione che si accompagna spesso alle fasi precoci della cGVHD è possibile che i cloni B autoreattivi non siano adeguatamente controllati e possano attivarsi, determinando la produzione di autoanticorpi. Perché ciò possa avvenire è comunque necessaria la presenza delle cellule T CD4. [14,15]

E' noto che i TKI possono interferire sia con l'immunità innata che con quella adattativa interagendo con differenti popolazioni cellulari: i linfociti B, i linfociti T, le cellule dendritiche e i macrofagi. [86-93] Il ruolo dei Treg nella patogenesi della cGVHD è ancora controverso e similmente il ruolo dei TKI nella modulazione di tale *pathway* non è ancora completamente caratterizzato. [16-18]

In questo lavoro è stato analizzato l'effetto di Nilotinib e di altri TKI su tutte le popolazioni linfocitarie, con particolare attenzione alla popolazione dei linfociti Treg.

Il Nilotinib, a concentrazioni terapeutiche, non riduce il numero dei linfociti Treg totali e non ne determina l'apoptosi. Independentemente dalla sua concentrazione, il farmaco non riduce il numero dei linfociti T totali, ma determina un blocco del ciclo cellulare in fase G1, con la conseguente riduzione del numero di cellule in grado di replicare. Dati simili sono stati ottenuti dal gruppo di Fei Fei [92] che ha evidenziato che Nilotinib, a dosi clinicamente rilevanti, non ostacola la funzionalità dei Treg. Dosi sovramassimali non impattano in maniera statisticamente significativa sui linfociti T totali, ma determinano la morte selettiva dei Treg.

Inoltre, come dimostrato dal lavoro di Chen J et al [119] questo TKI non svolge un'azione citotossica nei confronti di tutte le popolazioni linfocitarie, ma ha un'azione citostatica determinando una riduzione della concentrazione delle citochine prodotte e secrete nel surnatante fino alla totale inibizione a concentrazioni massimali di Nilotinib. I nostri dati supportano questo modello in quanto mostrano una riduzione progressiva delle principali citochine infiammatorie (IL-13, IL-17, IFN γ e TNF α) che è tanto più evidente quanto più sono elevate le dosi del TKI.

Analogamente a quanto pubblicato da Larmonier [93], abbiamo riscontrato che concentrazioni terapeutiche di Imatinib, non riducono il numero dei linfociti T totali né dei Treg e non ne determinano l'apoptosi.

A differenza di Nilotinib, l'Imatinib non ha determinato una riduzione statisticamente significativa delle citochine prodotte e secrete nel surnatante delle colture cellulari. Questo dato contrasta con i risultati descritti nel lavoro di Cwynarski del 2004 [89], tuttavia il nostro studio è stato svolto in condizioni sperimentali diverse, in quanto noi abbiamo lavorato con colture di PBMC o di linfociti T (CD3+), mentre il gruppo londinese ha utilizzato il farmaco su colture pure di linfociti T helper o T citotossici.

Come descritto nell'articolo di Blake [120] il Dasatinib, determina un'inibizione di tutte le popolazioni di cellule T anche a dosi subterapeutiche, che si traduce anche in una riduzione di concentrazione di citochine pro-infiammatorie nei surnatanti delle colture cellulari. [121] Tuttavia, a differenza di Nilotinib anche la popolazione Treg risulta essere inibita. [122] I nostri dati confermano questo modello di inibizione in quanto si riscontra un aumento di mortalità statisticamente significativa di tutte le popolazioni linfocitarie a partire dalla concentrazione più bassa di Dasatinib. Nei surnatanti delle colture cellulari si assiste ad una diminuzione delle citochine proinfiammatorie a partire dalla concentrazione terapeutica di Dasatinib.

Non ci risulta che siano ancora stati pubblicati studi in vitro sull'azione del Ponatinib sulle popolazioni linfocitarie. In questo lavoro abbiamo osservato che concentrazioni terapeutiche di Ponatinib, riducono il numero dei linfociti Treg totali e Treg Naive determinandone l'apoptosi; alle stesse concentrazioni il farmaco determina la morte cellulare anche delle popolazioni T NK, NK e B.

In conclusione questi dati sperimentali suggeriscono che, nell'ambito dei diversi TKI, Nilotinib conferma di possedere spiccate proprietà antifibrotiche e mostra un'efficace attività immunomodulante in vitro, che si traduce in un'evidente riduzione della produzione di citochine infiammatorie coinvolte nella cGVHD, mentre, contrariamente agli inibitori della calcineurina, preserva la funzione dei Treg.

Questo lavoro offre dati importanti per studiare la fibrosi nella cGVHD in vitro: infatti i fibroblasti patologici si espandono in coltura, esprimono elevati livelli di collagene basali e mantengono intatte le caratteristiche immunofenotipiche e di differenziazione

multilineare. Si ha inoltre evidenza che il Nilotinib, in vitro, è in grado di inibire la fibrosi dei fibroblasti patologici.

Nel complesso questi dati sperimentali supportano il potenziale utilizzo dei TKI ed in particolare di Nilotinib nella cGVHD.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Lezioni di ematologia, S. Tura, 2003
- [2] Immunologia David Male, Jonathan Brostoff, David B. Roth, 2007
- [3] Haematopoietic Stem Cell Transplantation, 2008.
- [4] Cornetta K, Laughlin M, Carter S et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:149-60.
- [5] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P et al. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-61
- [6] Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-80
- [7] Barnes Dw, Ford Ce, Loutit Jf Serial grafts of homologous bone marrow in irradiated mice. *Sang.* 1959;30:762-5.
- [8] Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003 9, 215-233
- [9] Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-56
- [10] Pavletic SZ, Lee SJ, Socie G et al. Chronic graft-versus-host disease: implications of the National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:645-51
- [11] Haematopoietic Stem Cell Transplantation, The EBMT Handbook, 2012
- [12] Ferrara JLM, Antin JH. (2004) The pathophysiology of graft-vs.-host disease. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, eds. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing; 353-368
- [13] Zecca M, Prete A, Rondelli R et al. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002;100:1192-200.
- [14] Rozendaal L, Pals ST, Gleichmann E et al. Persistence of allospecific helper T cells is required for maintaining autoantibody formation in lupus-like graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol.* 1990;82(3):527-532
- [15] Patriarca F, Skert C, Sperotto A et al. The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery. *Exp Hematol.* 2006;34(3):389-396
- [16] Feng G, Chan T, Wood KJ et al. Donor reactive regulatory T cells. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009 Aug;14(4):432-8

- [17] Pillai AB, George TI, Dutt S et al. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4458-67
- [18] Xue F, Chen W, Wang X et al. Regulatory T cells contribute to the immunoregulatory effect on graft versus host reaction after liver transplantation in donor-dominant one-way MHC matching rats. *Transpl Immunol*. 2009 Mar;20(4):232-7. doi: 10.1016/j.trim.2008.11.003
- [19] Soiffer R. Immune modulation and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Aug;42 Suppl 1:S66-S69
- [20] Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, von Bergwelt-Baildon MS. (2009) The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*. 114, 4919-27
- [21] Kapur R, Ebeling S, Hagenbeek A. B-cell involvement in chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 2008. 93, 1702-1711.
- [22] Svegliati S, Canello R, Sambo P et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):36474-82
- [23] Svegliati S, Santillo MR et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354, 2667-76
- [24] Svegliati S, Olivieri A, Campelli N et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007;110:237-41
- [25] McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol*. 1999 163, 5693-9.
- [26] Kim DH, Sohn SK, Lee NY et al. Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur J Haematol* 2005; 75: 299–308.
- [27] Larghero J, Rocha V, Porcher R et al. Association of bone marrow natural killer cell dose with neutrophil recovery and chronic graft-versus-host disease after HLA identical sibling bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2007; 138: 101–109.
- [28] Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y et al. Decrease of CD4(β)CD25(β) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res* 2010; 34: 1158–1168.
- [29] Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104: 2187–2193.

- [30] Morariu-Zamfir R, Rocha V, Devergie A et al. Influence of CD34(β) marrow cell dose on outcome of HLA-identical sibling allogeneic bone marrow transplants in patients with chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 575–580.
- [31] Skert C, Damiani D, Michelutti A et al. Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 729–737.
- [32] Ritchie D, Seconi J, Wood C et al. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 706–712.
- [33] Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT et al. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6107–6114.
- [34] Pratt LM, Liu Y, Ugarte-Torres A et al. IL15 levels on day 7 after hematopoietic cell transplantation predict chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 722–728.
- [35] Tanaka J, Imamura M, Kasai M, et al. The important balance between cytokines derived from type 1 and type 2 helper T cells in the control of graft-vs-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19:571–576
- [36] Tyndall A, Dazzi F. Chronic GVHD as an autoimmune disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(2): 281–289
- [37] Rozendaal L, Pals ST, Gleichmann E, Melief CJM. Persistence of allospecific helper T cells is required for maintaining autoantibody formation in lupus-like graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. 1990;82(3):527–532
- [38] Inamoto Y, Murata M, Katsumi A et al. Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 363–369.
- [39] Shimura K, Ashihara E, Shimazaki C et al. Circulating endothelial progenitor cells decreased in patients with Chronic GVHD biomarkers *J Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Apr;14(4):426-37
- [40] Abrahamsen IW, Somme S, Heldal D et al. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica* 2005; 90: 86–93.
- [41] Dander E, Balduzzi A, Zappa G et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009; 88: 1261–1272.
- [42] D’Asaro M, Dieli F, Caccamo N et al. Increase of CCR7-CD45RA β CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* 2006; 20: 545–547.

- [43] Yamashita K, Choi U, Woltz PC et al. Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4(β) effector memory cells relative to central memory cells. *Blood* 2004; 103: 3986–3988.
- [44] Tanaka J, Imamura M, Kasai M, et al. Cytokine gene expression by concanavalin A-stimulated peripheral mononuclear cell after bone marrow transplantation, an indicator of immunological abnormality due to chronic graft-vs-host disease. *Bone Marrow Transpl.* 1994;14:695–701
- [45] Fujii H, Cuvelier G, She K et al. Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children’s Oncology Group. *Blood* 2008; 111: 3276–3285.
- [46] Rozmus J, Schultz KR, Wynne K et al. Early and late extensive chronic graft-versus-host disease in children is characterized by different Th1/Th2 cytokine profiles: findings of the Children’s Oncology Group Study ASCT0031. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1804–1813.
- [47] Barak V, Levi-Schaffer F, Nisman B, Nagler A. Cytokine dysregulation in chronic graft versus host disease. *Leuk Lymphoma* 1995; 17: 169–173
- [48] J Pidala, M Sarwal, S Roedder, SJ Lee Biologic markers of chronic GVHD *Bone Marrow Transplantation* (2014) 49, 324–331
- [49] Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F et al. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 16, 1611-28.
- [50] Koc S, Leisenring W, Flowers et al. Therapy for chronic graft-versus-host disease: A randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 2002;100: 48–51.
- [51] Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Chou TC, Stepkowski S. Synergistic effect of the rapamycin-cyclosporine combination: median effect analysis of in vitro immune performances by human T lymphocytes in PHA, CD3, and MLR proliferative and cytotoxicity assays. *Transplant Proc* 1991;23:1090-1.
- [52] Dumont FJ. Alemtuzumab (Millennium/ILEX). *Curr Opin Investig Drugs.* 2001;2:139-60.
- [53] Rosman Z, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. *BMC Med.* 2013;11:88.
- [54] Couriel DR, Hosing C, Saliba R, et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood.* 2006 107, 3074–3080
- [55] Flowers ME, Apperley JF, van Besien K, et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2008 112, 2667–2674

- [56] Goussetis E1, Varela I, Tsigotis P. Transfus Apher Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children. *Sci.* 2012 Apr;46(2):203-9.
- [57] Carella AM, Biasco S, Nati S, Congiu A, Lerma E. (2007) Rituximab is effective for extensive steroid-refractory chronic graft-vs.-host-disease. *Leuk Lymphoma.* 48, 623–624
- [58] Mohty M, Marchetti N, El Cheikh J, Faucher C, Furst S, Blaise D. (2008) Rituximab as salvage therapy for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 41, 909–911
- [59] Okamoto M, Okano A, Akamatsu S, et al. (2006) Rituximab is effective for steroidrefractory sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Leukemia.* 20, 172–173
- [60] Teshima T, Nagafuji K, Henzan H, et al. (2009) Rituximab for the treatment of corticosteroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 90, 253–260
- [61] Canninga-van Dijk MR, van der Straaten HM, Fijnheer R, et al. (2004) Anti-CD20 monoclonal antibody treatment in 6 patients with therapy-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 104, 2603-2606.
- [62] Ratanatharathorn V, Ayash L, Reynolds C, et al. (2003) Treatment of chronic graft-versus-host disease with anti-CD20 chimeric monoclonal antibody. *Biol Blood Marrow Transplant.* 9, 505-511.
- [63] Zaja F, Bacigalupo A, Patriarca F, et al. (2007) Treatment of refractory chronic GVHD with rituximab: a GITMO study. *Bone Marrow Transplant.* 40, 273–277
- [64] Von Bonin M, Oelschlagel U, Radke J, et al. (2008) Treatment of chronic steroid-refractory graft-versus-host disease with low-dose rituximab. *Transplantation.* 86, 875–879
- [65] Kharfan-Dabaja MA, Mhaskar AR, Djulbegovic B, Cutler C, Mohty M, Kumar A. (2009) Efficacy of rituximab in the setting of steroid-refractory chronic graft-versus-host disease: a systematic review and meta-analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 15, 1005–1013
- [66] Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3383-9.
- [67] Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011 Jun;24(2):203-16.
- [68] Vogelsang GB. (2001) How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 97, 1196-201.
- [69] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000; 295: 139–145
- [70] Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*, 2000; 96: 925–932

- [71] Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol.* 2003 Feb;4(2):75-85.
- [72] Hunter T. (2007) Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. *J Clin Invest.* 117, 2036-43.
- [73] Olivieri A, Locatelli F, Zecca M et al. Imatinib for refractory chronic graft-versus-host disease with fibrotic features. *Blood.* 2009 Jul 16;114(3):709-18.
- [74] Weisberg E. and Griffin J. D. Mechanisms of resistance to the Abl tyrosine kinase inhibitor STI571 in Bcr/Abl-transformed hematopoietic cell lines. *Blood.* 2000; 95: 3498-3505.
- [75] Mahon F.X., Deininger M.W., Schultheis B, et al. Selection and characterization of Bcr-Abl positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood.* 2000; 96: 1070-1079.
- [76] La Rosée P, Deininger MW. Resistance to imatinib: mutations and beyond. *Semin Hematol.* 2010 Oct;47(4):335-43.
- [77] Kosior K, Lewandowska-Grygiel M, Giannopoulos K, Tyrosine kinase inhibitors in hematological malignancies *Hig Med Dosw,* 2011;65:819-28.
- [78] Weisberg E, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell.* 2005 7, 129-41
- [79] Mahon FX, Hayette S, Lagarde V et al. Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res.,* 2008; 68: 9809–9816
- [80] Xiaoyan Pan, Fang Wang, Yanmin Zhang, et al Design, synthesis and biological activities of Nilotinib derivatives as antitumor agents *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (2013) 2527-2534
- [81] Michael W. Deininger Nilotinib *Clin Cancer Res* 2008;14:4027-4031.
- [82] Olivieri A, Manzione L, Dasatinib: a new step in molecular target therapy. *Ann. Oncol.,* 2007; 18(Suppl.6): vi42–vi46
- [83] Gozgit JM, Wong MJ, Wardwell S et al. Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Mol. Cancer Ther.,* 2011; 10: 1028–1035
- [84] Manley PW1, Cowan-Jacob SW, Mestan J Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 30;1754(1-2):3-13
- [85] Weisberg E1, Manley P, Mestan J et al. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer.* 2006 Jun 19;94(12):1765-9.
- [86] Seggewiss R, Price DA, Purbhoo MA. (2008) Immunomodulatory effects of imatinib and second-generation tyrosine kinase inhibitors on T cells and dendritic cells: an update. *Cytotherapy.* 10, 633-41.

- [87] Seggewiss R, Lore K, Greiner E, et al. (2005) Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated Tcell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood*. 105, 2473-2479.
- [88] Ho S, Clipstone N, Timmermann L, et al. (1996) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol*. 80, S40-45
- [89] Cwynarski K, Laylor R, Macchiarulo E et al. (2004) Imatinib inhibits the activation and proliferation of normal T lymphocytes in vitro. *Leukemia*. 18, 1332-9.
- [90] Schade AE, Schieven GL, Townsend R et al. (2008) Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood*. 111, 1366-77.
- [91] Das J, Chen P, Norris D et al. 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]]1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor. *J Med Chem*. 2006; 49, 6819-32.
- [92] Fei F, Yu Y, Schmitt A et al. Effects of nilotinib on regulatory T cells: the dose matters. *Mol Cancer*. 2010 Jan 29;9-22
- [93] Larmonier N, Janikashvili N, LaCasse CJ et al. (2008) Imatinib mesylate inhibits CD4+ CD25+ regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL- tumors. *J Immunol*. 181, 6955-63.
- [94] Appel S, Boehmler AM, Grünebach F et al. (2004) Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood* 103, 538-44.
- [95] Appel S, Rupf A, Weck MM et al. (2005) Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res*. 11, 1928-40
- [96] Aono Y, Nishioka Y, Inayama M et al. (2005) Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 171, 1279-85.
- [97] Distler JH, Jüngel A, Huber LC et al. (2007) Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum*. 56, 311-22.
- [98] Iwamoto N, Distler JH, Distler O. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic sclerosis: from animal models to clinical trials. *Curr Rheumatol Rep*. 2011 Feb;13(1):21-7.
- [99] Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M et al. (2008) Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. *FASEB J*. 22, 2214-22.
- [100] Daniels CE, Wikes MC, Edens M, et al. (2004) Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin mediated lung fibrosis, *J Clin Invest*. 114, 1308– 1316

- [101] Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. (2005) Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J.* 19, 1-11.
- [102] Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S et al. (2005) Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288, G907-13.
- [103] Gordon J, Spiera R. (2011) Imatinib and the treatment of fibrosis: recent trials and tribulations. *Curr Rheumatol Rep.* 13, 51-8.
- [104] Deininger M, Schleuning M, Greinix H et al, European Blood and Marrow Transplantation Group. (2006) The effect of prior exposure to imatinib on transplant-related mortality. *Haematologica.* 91, 452-9.
- [105] Giralt SA, Arora M, Goldman JM et al. Chronic Leukemia Working Committee, Center for International Blood and Marrow Transplant Research. (2007) Impact of imatinib therapy on the use of allogeneic haematopoietic progenitor cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 137, 461-7.
- [106] Oehler VG, Gooley T, Snyder DS et al. (2007) The effects of imatinib mesylate treatment before allogeneic transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 109, 1782-9.
- [107] Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., et al. (2006) Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia chromosome-Positive ALL. *New Engl J Med* 354, 2542-51
- [108] Rosti G, Palandri F, Castagnetti F et al. GIMEMA CML Working Party. (2009) Nilotinib for the frontline treatment of Ph(+) chronic myeloid leukemia. *Blood.* 114, 4933-8.
- [109] Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts *Exp Dermatol.* 2008 Nov;17(11):925-32
- [110] Junker JP1, Sommar P, Skog M, Johnson H, Kratz G Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs.* 2010;191(2):105-18
- [111] Krieg T, Perlish JS, Mauch C, Fleischmajer R Collagen synthesis by scleroderma fibroblasts *Ann N Y Acad Sci.* 1985;460:375-86.]
- [112] Krieg T, Perlish JS, Fleischmajer R, Braun-Falco O Collagen synthesis in scleroderma: selection of fibroblast populations during subcultures. *Arch Dermatol Res.* 1985;277(5):373-6.9):
- [113] Fleming JN, Shulman HM, Nash RA, et al. Cutaneous chronic graft-versus-host disease does not have the abnormal endothelial phenotype or vascular rarefaction characteristic of systemic sclerosis. *PLoS ONE.* 2009 4(7):e6203
- [114] Kulozik M1, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis *J Clin Invest.* 1990 Sep;86(3):917-22.)

- [115] Magro L, Mohty M, Catteau B et al. Imatinib mesylate as salvage therapy for refractory sclerotic chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):719-22. doi: 10.1182/blood-2009-02-204750. Epub 2009 Mar 16.
- [116] Olivieri A, Cimminiello M, Corradini P et al. Long-term outcome and prospective validation of NIH response criteria in 39 patients receiving imatinib for steroid-refractory chronic GVHD. *Blood*. 2013 Dec 12;122(25):4111-8.
- [117] Pidala J, Anasetti C. Can antigen-specific regulatory T cells protect against graft versus host disease and spare anti-malignancy alloresponse? *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):660-5
- [118] Olivieri J, Coluzzi S, Attolico I, Olivieri A. Tyrosin kinase inhibitors in chronic graft versus host disease: from bench to bedside. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:1908-31
- [119] Chen J, Schmitt A, Chen B et al. Nilotinib hampers the proliferation and function of CD8+ T lymphocytes through inhibition of T cell receptor signalling *Cell Mol Med*. 2008 Oct;12(5B):2107-18.
- [120] Blake S1, Hughes TP, Mayrhofer G, Lyons AB The Src/ABL kinase inhibitor dasatinib (BMS-354825) inhibits function of normal human T-lymphocytes in vitro. *Clin Immunol*. 2008 Jun;127(3):330-9
- [121] Blake SJ, Bruce Lyons A, Fraser CK et al. Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4415-6
- [122] Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, et al. Dasatinib inhibits the proliferation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Br J Haematol*. 2009 Jan;144(2):195-205

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito al raggiungimento di questo importante traguardo.

Un grazie particolare va al Prof. Attilio Olivieri che, nonostante i suoi numerosissimi impegni, mi ha accolta a braccia aperte nel suo Gruppo Trapianti e ha sempre trovato del tempo ed attenzione per me, mettendo a disposizione la sua infinita conoscenza e professionalità.

Inoltre, ringrazio sentitamente il Prof. Pietro Leoni e l'AIL che mi hanno permesso di lavorare nel laboratorio della Clinica di Ematologia facendomi conoscere ed apprezzare il mondo della ricerca universitaria.

Non posso fare a meno di ringraziare il Dott. Jacopo Olivieri che, con i suoi numerosissimi consigli, mi ha permesso di superare i problemi che ho incontrato nello sviluppo del presente lavoro.

Ringrazio tutti i dottori e le dottoresse della Clinica di Ematologia e del Gruppo Trapianti per avermi reso partecipe del loro lavoro, in particolare la Dott.ssa Giorgia Mancini.

Un grazie grandissimo va al Dott. Andrea Costantini e alla Dott.ssa Nadia Viola della Clinica di Immunologia per la loro infinita disponibilità e per avermi accolta a braccia aperte in un clima amichevole e informale, facendomi sentire sempre "a casa".

Ringrazio le biologhe e le tecniche del laboratorio della Clinica di Ematologia, che mi hanno "supportato e sopportato" quotidianamente, in particolare la Dott.ssa Stefania Mancini sempre presente e paziente, Aurora, Silvia, Laura e Giovanna per il loro preziosissimo aiuto, ma anche per le pause caffè e le chiacchiere.

Desidero ringraziare con affetto la mia famiglia che mi è stata sempre vicina.

In ultimo, ma sempre nel mio cuore, ringrazio infinitamente Valerio che ha sempre creduto in me, è sempre stato al mio fianco e ha reso possibile il raggiungimento di questo importante traguardo, per il mio futuro e per il nostro.