

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE XVII Ciclo – 2002 - 2006

COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE

TESI DI DOTTORATO

**Il ruolo dei linfociti T CD8 e CD4 positivi nella formazione del
circolo collaterale dopo ischemia periferica.**

TUTORE

Chiar.mo

Prof. Massimo Chiariello

CANDIDATA

Dott.

Eugenio Stabile

Introduzione

Lo sviluppo di vasi collaterali, arteriogenesi, è un fenomeno complesso che richiede l'azione coordinata nel tempo e nello spazio di molteplici componenti cellulari

Tenendo presente il ruolo, ben dimostrato in letteratura dell'azione del sistema monocito-macrofagico (1) nella regolazione della formazione dei vasi collaterali, abbiamo concentrato la nostra attenzione sul possibile ruolo svolto dai linfociti.

I Linfociti T sono naturalmente coinvolti in fenomeni caratterizzati da attiva angiogenesi, siano essi fisiologici, come la guarigione delle ferite e la difesa dalle infezioni, o patologici come la crescita tumorale e lo sviluppo della placca (2).

Sebbene sia le cellule CD4+ che le CD8+ , principali sottopopolazioni dei linfociti T, partecipino attivamente a questi processi, le cellule CD4+ sembrano più attive nel secernere citochine (compreso un vasto numero di fattori angiogenici) e nel modulare il coinvolgimento di altre componenti cellulari del sistema immune (come i monociti ed i macrofagi). Basti ricordare che, in modelli sperimentali murini, l'assenza delle cellule T (3) o dei macrofagi circolanti (1) si accompagna ad una severa riduzione della formazione dei vasi collaterali in risposta all'ischemia periferica.

Scopo del nostro studio è stato quello di determinare se la componente cellulare del sistema immunitario fosse elemento indispensabile nella formazione dei vasi collaterali. In particolare abbiamo studiato se e come i linfociti T CD4+ e CD8+ siano elementi critici nello sviluppo del circolo collaterale.

Materiali e Metodi

Modello murino di ischemia dell'arto posteriore

Previa narcosi per via intramuscolare con xylazina (40 mg/kg) e ketamina (100 mg/kg), topi, a 12 settimane di età, C57BL/6, CD4^{-/-} (4) e CD8^{-/-} (5) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) sono stati sottoposti a legatura dell'arteria femorale superficiale (4) al fine di indurre ischemia dell'arto posteriore (14 animali per gruppo). I protocolli sperimentali sono stati approvati dall' Animal Care and Use Committee del MedStar Research Institute, USA.

Laser Doppler Perfusion Imaging

Misurazioni ripetute del flusso ematico dell'arto nella regione di interesse (dalla patella al metatarso) sono state acquisite prima (vaseline), immediatamente dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale (post), e nelle quattro settimane susseguenti tramite l'impiego del Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) (Moor Instruments). I valori vengono espressi come rapporto tra la perfusione dell'arto ischemico (ischemic) e quella dell'arto di riferimento (normal) (6)

Valutazione del recupero funzionale

Nel corso del follow up, la valutazione semiquantitativa della riduzione funzionale (3 = trascinarsi del piede, 2 = assenza di flessione plantare, 1 = presenza di flessione plantare, 0 = flessione delle dita dopo trazione posteriore) e l'entità di danno ischemico (0 = nessuna differenza rispetto all'arto controlaterale, 1 = lieve discromia, 2 = moderata discromia, 3 = severa discromia o necrosi di tessuto sottocutaneo, 4 = autoamputazione) sono state valutate in cieco da due diversi sperimentatori (7).

Colture tessutali

In settima giornata un campione tessutale è stato prelevato dall'incisione chirurgica e posto in coltura (Becton Dickinson) per 48 ore al fine di escludere la presenza di superinfezioni nei topi immunodeficienti (7)

Tecnica di western blotting

A differenti tempi dopo l'intervento chirurgico, campioni muscolari sono stati prelevati, lisati in RIPA buffer per estrazione proteica (8). Le proteine sono state separate attraverso un gel SDS-PAGE e trasferite su filtro di nitrocellulosa (Invitrogen). Le proteine specifiche sono state rilevate tramite anticorpi monoclonali a differenti diluizioni (1:500 per anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) [Chemicon, Temecula, California]; (1:250 per anti-IL-16; 1:1000 per α -tubulin [Santa Cruz, Santa Cruz, California]) (7, 9).

Tecnica di immunofluorescenza

Agli stessi tempi, i muscoli adduttori sono stati congelati, sezionati al criostato, fissati in metanolo ed incubati per 12 ore con anticorpi primari monoclonali (1:50 per anti-IL-16; 1:50 per anti-CD4; Santa Cruz; 1:500 per anti-Mac3, Pharmingen [San Diego, California]; 1:1000 per anti-VEGF, Santa Cruz), successivamente sono stati incubati con anticorpi secondari determinanti immunofluorescenza FITC- anti goat (Santa Cruz) o

Rodamine–anti-rat antibody (Vector Laboratories, Burlingame, California). Il mezzo di montaggio DAPI (Vector Laboratories) è stato impiegato per identificare le cellule vitali. Un microscopio ECLIPSE TE300 ed un software Magnafire (Optronics) sono stati utilizzati per analizzare i tessuti (7, 9)

Citofluorimetria di flusso per la determinazione dell'infiltrato cellulare

Sette giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, I muscoli adduttori venivano espianati, pesati, dissociate meccanicamente ed incubati in buffer di lisi (HBSS con 400 U/ml collagenase II e 12 U/ml DNase I) (10). le cellule isolate venivano sospese ed incubate in soluzione con Fc block (PBS–3% FBS), immediatamente seguita da incubazione con anticorpi primari (FITC–anti- CD4, FITC–anti-Mac3, PE–anti-CD25; Pharmingen). L'analisi è stata effettuata tramite FACScan (Becton Dickinson), ed I dati analizzati tramite il software Cell Quest software (7).

Analisi Istologica

Dopo aver completato il follow up, I muscoli adduttori, quadricipite femorale ed il gastrocnemio venivano espianati e fissati in formalina. Dai muscoli della coscia, se ne preparavano sezioni che venivano colorate con la soluzione di Van Gieson's. In queste sezioni, venivano identificate e contate tutte quelle arteriose che presentavano una membrana elastica interna continua, uno strato completo di cellule muscolari lisce ed un area, matematicamente derivata, uguale o superiore a $300 \mu\text{m}^2$. Il numero di arterie presenti in ciascun adduttore veniva espresso come densità di arterie (11).

Dal gastrocnemio, se ne preparavano sezioni che venivano colorate con soluzione di Rosso Sirio (12) al fine di identificare la quantità di collagene presente. In queste sezioni, l'area muscolare veniva calcolata e divisa per il numero di fibre muscolari presenti nel campo in esame al fine di ottenere la media della dimensione delle fibre muscolari in un dato campo (7).

Recupero del fenotipo tramite infusione di cellule wt in topi KO

Da topi simili (C57BL/6 o IL 16 -/-) (13) per sesso ed età, venivano estratte cellule mononucleari spleniche e separate, a seconda dell'esperimento in, CD4 +, CD4 -, CD8 +, CD8 - grazie all'impiego della selezione positive tramite marcatura magnetica (Miltenyi Biotechnology, Inc).

A tempi differenti dopo la legatura dell'arteria femorale, 3×10^5 cellule mononucleari selezionate venivano infuse in topi KO per via endovenosa. Per valutare la capacità di localizzazione tessuto specifica (homing) di ciascuna componente cellulare gruppi a se di animali venivano sottosti al medesimo protocollo sperimentale con iniezione di cellule marcate con specifico tracciante fluorescente (CFDA-SE, Molecular Probes Inc) (14). In questo caso gli animali venivano sacrificati dopo 24 ore ed i muscoli adduttori venivano processati per l'identificazione della fluorescenza tessutale. La densità di cellule marcate nel campo esaminato è stata determinata

Statistical Analysis

I risultati sperimentali vengono presentati come media \pm SEM. Il test t di Student è stato impiegato per comparare valori assoluti e normalizzati. Il test REMANOVA per compare

i valori di gruppi diversi nel tempo. Un valore di probabilità inferiore a 0.05 è stato considerato significativo (7, 9)

Risultati

Recupero del flusso ematico dell'arto dopo legatura dell'arteria femorale superficiale

Nei topi di controllo (C57BL/6), il flusso ematico all'arto si reduce drammaticamente dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, resta severamente ridotto per i susseguenti 3 giorni, recupera al 70% del valore presente nell'arto non ischemico in settima giornata, raggiunge poi nuovamente il valore basale al termine della quarta settimana. Tale recupero del flusso ematico è sensibilmente attenuato nei topi CD4^{-/-} (Figura 1a). Se confrontato con quello dei topi C57BL/6, il flusso nei topi CD4^{-/-} era significativamente inferiore già in terza giornata e si manteneva tale nei time points successivi (7, 14, 21, and 28 giorni); il massimo recupero di flusso corrispondeva al 65% di quello misurato nell'arto controlaterale (Figura 1b).

Al termine del Follow up, i topi CD4^{-/-} presentavano una significativa riduzione del numero di arteriole nei muscoli della coscia dell'arto ischemico, se confrontati con i topi di controllo (0.36 ± 0.03 verso 0.46 ± 0.03 arterie $> 300 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ di area muscolare area; $P < 0.05$). Nessuna differenza poteva essere osservata nelle zampe non operate (Figura 1c). Nei topi di controllo, l'uso attivo del piede ischemico si riduceva in maniera drastica dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale (Figura 1d), rimaneva ridotto a tre giorni, iniziava migliorare a sette giorni, e ritornava pressoché normale dopo due settimane. Nei topi CD4^{-/-}, tale recupero era significativamente ridotto nel corso di tutto il follow-up; questi avevano anche un più severo danno ischemico dell'arto che risultava in un'incidenza di autoamputazione pari al 40% al termine del follow-up.

L'esame autoptico dei muscoli gastrocnemi mostrava una più pronunciata fibrosi interstiziale ed atrofia muscolare (Figura

2, a e b) nei topi CD4^{-/-} se confrontati con i topi di controllo (Figura 2, a e c).

Risposta infiammatoria tessutale all'ischemia

L'esame istologico dei muscoli adduttori e quadricipite, sette giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, mostrava una marcata infiltrazione leucocitaria nei topi wild-type. Differentemente, l'entità dell'infiltrato leucocitario era significativamente minore nei topi CD4^{-/-}. In particolare il numero di mononucleati Mac-3-positivi era minore nei topi CD4^{-/-} (Figura 3a). Negli stessi animali, una ridotta espressione di VEGF nei tessuti sede di attiva arteriogenesi, poteva essere osservata (Figura 3b). La duplice marcatura con MAC-3 e VEGF dimostrava la presenza di differenti foci di infiltrato infiammatorio con cellule macrofagiche esprimenti VEGF (Figura 3c).

Effetto della infusione di cellule CD4⁺ in topi CD4^{-/-} sottoposti a legatura dell'arteria femorale superficiale

Tre giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, abbiamo infuso per via venosa, in topi CD4^{-/-} leucociti splenici mononucleati CD4⁺ (gruppo CD4⁺) o CD4⁻ (gruppo CD4⁻) da topi di controllo. Ventiquattro ore dopo l'infusione le cellule CD4⁺ si

localizzavano selettivamente nelle aree di infiltrato leucocitario dell'arto ischemico (Figura 4a), dove arrivavano a rappresentare all'incirca il 10% delle cellule presenti per campo analizzato. Nessuna cellula esogena CD4+ poteva essere localizzata nelle zampe controlaterale sham-operated (Figure 4a). Allo stesso tempo non si rilevava localizzazione selettiva delle cellule CD4- negative negli arti ischemici (Figura 4a).

Sette giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, un maggiore infiltrato macrofagico ed una più consistente espressione di VEGF poteva essere documentata nei topi appartenenti al gruppo CD4+ (Figura 4, b, c, e d). Il recupero del flusso ematico nell'arto ischemico era sensibilmente migliore nei topi del gruppo CD4+ che in quelli del gruppo CD4-, e del tutto simile a quello degli animali C57BL/6. I topi del gruppo CD4+ un ridotto danno ischemico tessutale, (Figura 5b), una ridotta fibrosi ed atrofia muscolare, ed una riduzione del 75% dell'incidenza di autoamputazione (Figura 6b). Nessuna differenza è stata rilevata tra gli animali del gruppo CD4+ e quelli CD4 -/-.

Recupero della perfusione dell'arto ischemico dopo legatura dell'arteria femorale superficiale in topi CD8 -/-

Nei topi di controllo (C57BL/6), il flusso ematico all'arto si reduce drammaticamente dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, resta severamente ridotto per i susseguenti 3 giorni, recupera al 70% del valore presente nell'arto non ischemico in settima giornata, raggiunge poi nuovamente il valore basale al termine della quarta settimana. Tale recupero del flusso ematico è sensibilmente attenuato nei topi CD8 -/- (Figura 7a). Se confrontato con quello dei topi C57BL/6, il flusso nei topi CD8 -/- era significativamente inferiore già in terza giornata e si manteneva tale nei time points successivi (7, 14, 21, and 28 giorni); il massimo recupero di flusso corrispondeva al 65% di quello misurato nell'arto controlaterale (Figura 7b).

Nei topi di controllo, l'uso attivo del piede ischemico si riduceva significativamente dopo la chirurgia (Figura 7c), rimaneva deficitario per 7 giorni e poi gradualmente ritornava fisiologico dopo quattro settimane. Nei topi CD8 -/-, la capacità di recupero era invece marcatamente ridotta già dopo 7 giorni ed il mancato recupero funzionale persisteva per tutto il follow up. Tali animali presentavano anche un maggiore danno ischemico tessutale, che era ancor evidente 4 settimane dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale (Figura 7c) e determinava una maggiore incidenza di autoamputazione. Al termine dello studio, i topi CD8 -/- presentavano una ridotta densità di vasi collaterali nei muscoli della coscia degli arti ischemici, rispetto a quella osservata nei topi di controllo (0.33 ± 0.02 verso 0.44 ± 0.04 arterie $> 300 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ di area muscolare area; $P < 0.05$) (Figura 1c).

Effetto della infusione di cellule CD8+ in topi CD8 -/- sottoposti a legatura dell'arteria femorale superficiale

Immediatamente dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, abbiamo infuso splenociti monucleati CD8+ (CD8+ gruppo), ed abbiamo osservato che esse si localizzano selettivamente nelle aree di infiltrato infiammatorio degli arti ischemici, ma non nel controlaterale (Figura 8a). Il recupero del flusso ematico migliorava nei topi CD8

-/- riceventi cellule CD8+ rispetto ai CD8 -/- riceventi cellule CD8 - (gruppo CD8 -) (Figura 8b). Nel corso del follow up, per tutti i time points, il flusso dei topi del gruppo CD8 + era del tutto simile a quello dei topi C57BL/6 di controllo. Questi topi presentavano un ridotto danno ischemico tissutale ed (Figura 8c) una ridotta difficoltà di deambulazione (Figura 8c). Infine l'esame istologico dei muscoli gastrocnemi, espuntati al termine del follow up, presentava una maggior contenuto di tessuto fibrotico ($10.8 \pm 1.2\%$ verso $6.6 \pm 1.3\%$; $P < 0.01$) (Figura 9a and 9b) ed una maggiore atrofia muscolare nei topi CD8 -/- rispetto ai topi wild-type C57BL/6 (mean fiber area, 785 ± 68 verso $1067 \pm 69 \mu\text{m}^2$; $P < 0.01$). Infine, il miglior recupero di flusso osservato nei topi del gruppo CD8+ si associava ad una riduzione del contenuto di tessuto fibrotico e di atrofia muscolare (Figura 9a and 9b). Nessuna differenza poteva essere rilevata tra il gruppo CD8 -/- ed il gruppo CD8-.

Risposta infiammatoria tissutale all'ischemia periferica

L'analisi istologica dei muscoli della coscia dell'arto ischemico, mostrava un maggior grado di infiltrato infiammatorio nei topi di controllo rispetto ai topi CD8 -/-. In particolare, il numero di leucociti CD4 positivi era significativamente ridotto nei topi CD8 -/- (Figure 10a). Infine negli animali di controllo, si osservava la caratteristica induzione di IL-16 dopo legatura dell'arteria femorale superficiale, nelle sedi di infiltrato infiammatorio (Figura 10b). Tale induzione era pressoché assente nei topi CD8 -/- (Figure 10b).

La carenza di IL-16 impedisce alle cellule CD8+ di migliorare il recupero di flusso ematico dell'arto ischemico in topi CD8 -/-

In topi CD8-/-, si osservava la ricostituzione dell'espressione di IL-16 2 giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale e l'infusione di cellule CD8+ (Figura 11a). La co-localizzazione del tracciante citosolico ex vivo ed della positività per IL16 in CD8 -/-ri-constituiti, dimostrava che erano le cellule esogene CD8 + ad esprimere IL-16 (Figura 11a). Quarantotto ore dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, negli arti ischemici dei topi del gruppo CD8+, l'espressione di IL-16 era pressoché identica a quella dei topi C57BL/6 (Figura 11b), e questo si associava ad un più consistente infiltrato leucocitario (Figura 11c). Infine, quando cellule CD8 + ma IL 16 -/- venivano infuse in topi CD8 -/- dopo legatura dell'arteria femorale superficiale, esse erano si capaci di localizzarsi selettivamente nell'arto ischemico, ma non di migliorare il recruitment in sede di mononucleati CD4+. Questo mancato recruitment risultava nella perdita della capacità di migliorare il recupero del flusso ematico ed il conseguente danno ischemico tissutale (Figura 11c and 11d).

Presenza di superinfezioni batteriche

I topi CD4 -/- e quelli CD8 -/-, in quanto immunodeficienti, potrebbero essere più suscettibili di quelli di controllo a possibili superinfezioni batteriche in seguito alla chirurgia, questo potrebbe inficiare la possibilità di recupero. Per escutare questa possibilità abbiamo prelevato e messo in coltura campioni di tessuto, dal campo

operatorio, sette giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale. Nessuna crescita batterica è stata documentata nei terreni di coltura.

Pertanto, l'aumentata incidenza di necrosi ed autoamputazione osservata nei topi CD4^{-/-} e CD8^{-/-} non era determinata dalla presenza di gangrena settica associata. Infine, i topi CD4^{-/-} e quelli CD8^{-/-} mostravano, nel corso del follow up, lo stesso recupero del peso perso in seguito alla chirurgia, osservato nei topi di controllo.

Discussione

Nel nostro studio, abbiamo impiegato un modello murino di ischemia dell'arto per determinare se la componente linfocitaria del sistema immunitario sia una componente necessaria nello sviluppo del circolo collaterale.

Dal nostro studio si evince che i linfociti CD4+ sono capaci di contribuire alla formazione del circolo collaterale attraverso la loro capacità di richiamare in sede le componenti cellulari del sistema monolito-macrofagico. Questi ultimi, una volta in sede secernono un ampio spettro di citochine e fattori di crescita, compreso il VAGF, che determinano lo sviluppo dei vasi collaterali (7).

I macrofagi hanno un ruolo cruciale nei processi di sviluppo arteriogenico postnatale in tessuti che vanno incontro ad angiogenesi. Essi secernono VEGF, TNF α , e bFGF, che sono indispensabili per l'angiogenesi. Infatti la carenza di macrofagi si associa ad una deficitaria risposta angiogenica (15). Un ruolo specifico per la componente linfocitaria è stato ipotizzato in precedenza, partendo dall'osservazione che topi nudi, che sono privi di tutte le popolazioni linfocitarie T, sono severamente immunocompromessi e presentano una ridotta risposta angiogenica all'ischemia dell'arto (1).

Infine, insieme all'effetto di recruitment del sistema monocito-macrofagico, I linfociti CD4+ potrebbero avere azione proangiogenica, per se (16, 17). Di nota è il fatto che l'ischemia tissutale potrebbe non essere uno stimolo sufficiente per indurre arteriogenesi. I vasi collaterali si originano da vasi preesistenti posizionati prossimali alle arterie ostruite e quindi lontani dalle sedi di ischemia (18). Sebbene, in condizioni basali poco flusso attraverso questi piccolo vasi ad alta resistenza, il flusso aumenta in seguito all'occlusione del vaso principale. Questo incremento di flusso determina un rimodellamento vascolare che porta allo sviluppo dei vasi collaterali funzionanti, una modifica probabilmente determinata dalla modifica dello shear stress parietale (19).

Un'interessante quesito, per studi futuri, è quello di determinare se l'ischemia sia lo stimolo di un tipo specifico di infiammazione – una che porti allo sviluppo del circolo collaterale – o se essa induca lo stesso stimolo pro-infiammatorio di altri stimoli nocivi, ma in presenza di alterato shear stress questa risposta generica sia in grado di modificare il rimodellamento vasale ed indurre arteriogenesi.

Nella seconda parte del nostro studio abbiamo dimostrato come anche la componente CD8+ dei linfociti T sia indispensabile per un efficace sviluppo del circolo collaterale in risposta all'ischemia. In particolare I linfociti CD8 sono capaci di rispondere precocemente all'ischemia periferica attraverso la secrezione di IL16 in situ. Quest'ultima è un'importante fattore chemiotattico per differenti cellule del sistema immunitario (monoliti, eosinofili, cellule dendritiche). Più specificamente IL-16 è un ligando specifico del recettore CD4 e induce risposta chemiotattica nelle cellule rispondenti. Degna di nota il fatto che in campioni autoptici umani di infarto cerebrale, i linfociti accorrono precocemente nelle zone ischemiche e secernono IL-16 (21, 22). Nel nostro esperimento, l'incapacità di secernere IL-16 in sede di attiva arteriogenesi compromette significativamente il recruitment di linfociti CD4+ e lo sviluppo di un circolo collaterale efficace. Si dimostra così l'importanza del ruolo dell'IL-16 nelle fasi iniziali della risposta infiammatoria all'ischemia periferica (9).

Il presente studio, insieme ad I dati attualmente disponibili in letteratura, dimostra come I linfociti T contribuiscano in maniera importante al rimodellamento arterioso che determina lo sviluppo del circolo collaterale in risposta all'ischemia periferica. I dati riportano potrebbero essere di aiuto per studi futuri miranti ad investigare possibili strategie terapeutiche per migliorare lo sviluppo del circolo collaterale in pazienti affetti da cardiopatia ischemica e/o arteriopatía ostruttiva degli arti inferiori.

Bibliografia

- 1) Arras M, Ito WD, Scholz D, et al. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1998;101:40–50.
- 2) Choy EHS, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001;344:907–916.
- 3) Couffinhal T, Silver M, Kearney M, et al. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE *-/-* mice. *Circulation*. 1999;99:3188–3198.
- 4) Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Schilham MW, et al. Normal development and function of CD8⁺ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature*. 1991;353:180–184.
- 5) CD8^{-/-}
- 6) Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, et al. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998;152:1667–1679.
- 7) Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*. 2003 15;108:205–210.
- 8) Esposito G, Sathyamangla V, Rapacciuolo A, et al. Cardiac overexpression of a Gq inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-jun NH2-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation*. 2002;103:1453–1455.
- 9) Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U, Shou M, Zbinden S, Fuchs S, Kornfeld H, Epstein SE, Burnett MS. CD8⁺ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4⁺ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation*. 2006 Jan 3;113(1):118–24.
- 10) Stevens SL, Bao J, Hollis J, et al. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 2002;932:110–119.
- 11) Lutun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*. 2002;8:831–840.
- 12) Yu HC, Burrell LM, Black MJ, et al. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. 1998;98:2621–2628.
- 13) Ren F, Zhan X, Martens G, Lee J, Center D, Hanson SK, Kornfeld H. Pro-IL-16 regulation in activated murine CD4⁺ lymphocytes. *J Immunol*. 2005;174:2738–2745.
- 14) Girgis L, Davis MM, Fazakas de St Groth B. The avidity spectrum of T cell receptor interactions accounts for T cell anergy in a double transgenic model. *J Exp Med*. 1999;189:265–278.
- 15) Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, et al. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest*. 2002;109:603–611.

- 16) Freeman MR, Schneck FX, Gagnon M, Freeman MR, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.* 1995;55:4140–4145.
- 17) Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, et al. Lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *PNAS.* 1994;91:2890–2894.
- 18) Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res.* 1999;43:835–837.
- 19) Goncalves LM, Epstein SE, Piek JJ. Controlling collateral development: the difficult task of mimicking mother nature. *Cardiovasc Res.* 2001;49:495–498.
- 20) Schwab JM, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. *J Neuroimmunol.* 2001;114: 232–241.
- 21) Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. Interleukin-16. *J Leukoc Biol.* 2000;67:757–766

Figure

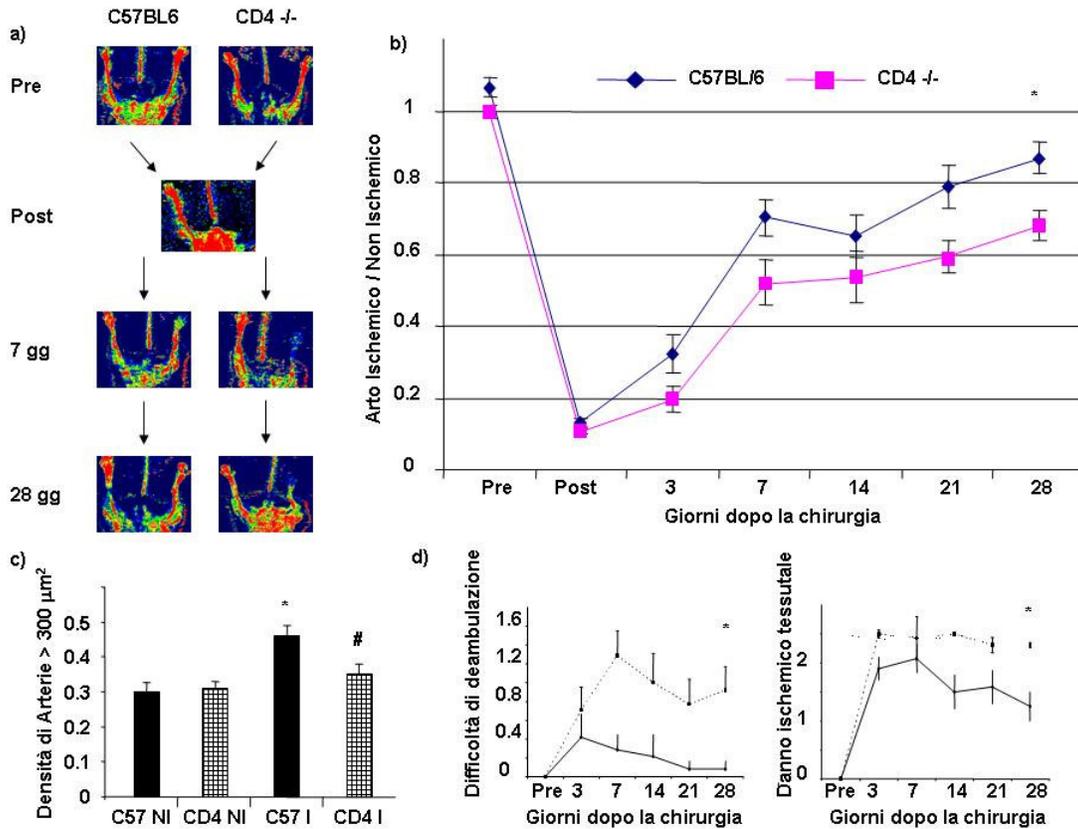


Figura 1. Ridotto sviluppo del circolo collaterale in topi CD4-/- .

a, Immagine rappresentativa della velocità di flusso ematico misurata nell'arto di topo con metodica laser Doppler imaging. Rosso è indice di alta velocità, blu di bassa velocità. b, Risultati cumulativi, espressi come rapporto tra arto ischemico ed arto non ischemico, del recupero di flusso ematico dopo legatura dell'arteria femorale superficiale in topi C57BL/6 (n =14) e topi CD4-/- . c, Densità di vasi collaterali nell'arto prossimale 28 giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale (#P=NS). d, Valutazione funzionale del muscolo ischemico durante il follow up. Rappresentazione grafica della difficoltà di deambulazione (destra) e del danno ischemico tessutale (sinistra) in topi C57BL/6 (linea continua) and nei topi CD4 -/- mice (linea tratteggiata) (*P=0.05).

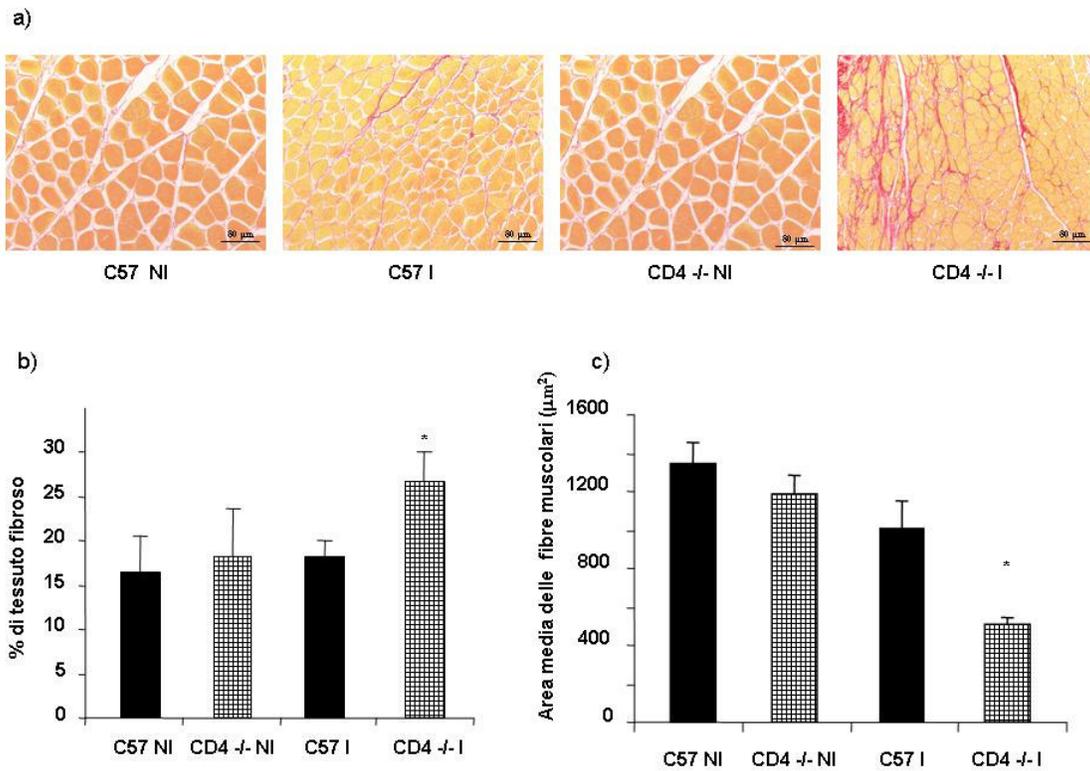


Figure 2. Modifiche strutturali del muscolo gastrocnemio dopo legatura dell'arteria femorale superficiale

a, Muscolo Gastrocnemio. Immagini rappresentative di sezioni istologiche colorate con metodica rosso sirio. In rosso sono colorate le fibre collagene ed in giallo le fibre muscolari

b. Rappresentazione grafica della quantità tessuto fibroso e dell'area media delle fibre muscolari nell'arto ischemico e nell'arto non ischemico dei topi C57BL6 e nei topi CD4 -/- (*P<0.05).

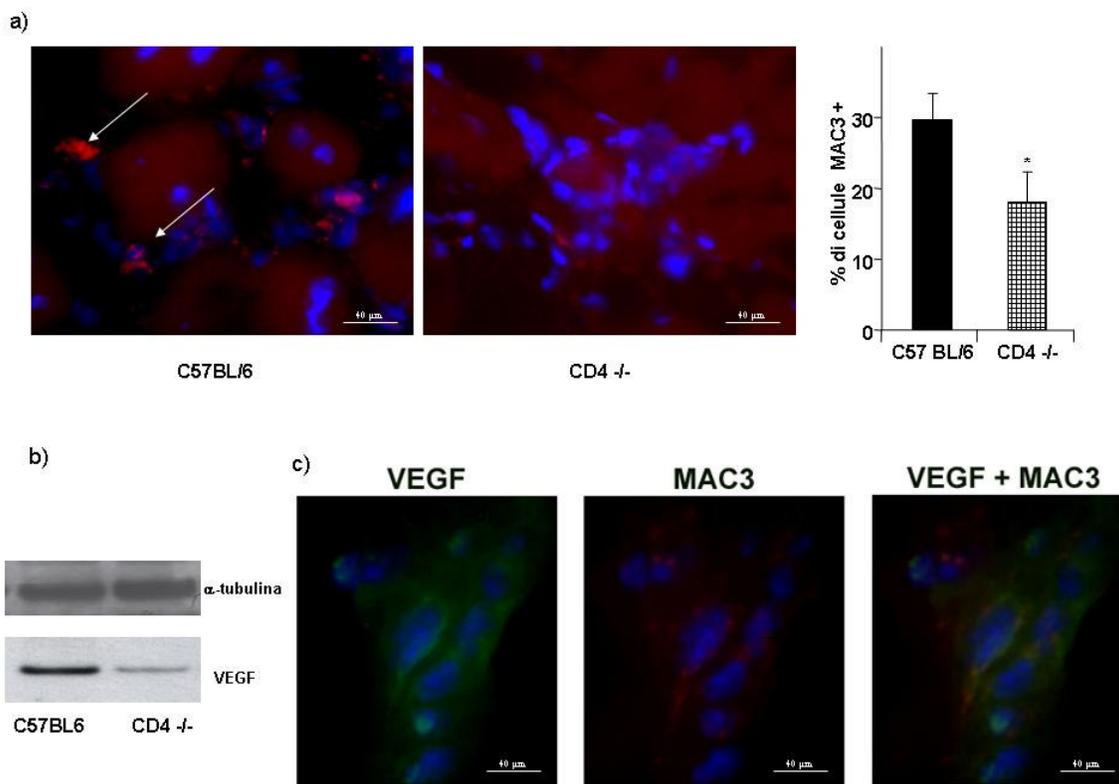


Figure 3. *Infiltrazione macrofagica ed espressione di VEGF 7 giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale*

Immunofluorescenza (a, sinistra e centro) rappresentativa dell'infiltrato macrofagico (colorati in rosso, indicate dalle frecce) nello spazio interstiziale tra le fibre muscolari del muscolo adduttore dell'arto ischemico (nuclei colorati in blu). Il numero di macrofagi infiltranti è significativamente ridotto nei topi CD4^{-/-} (a, destra) (*p<0.05).

b, Espressione di VEGF da arti ischemici di topi CD4^{-/-} e C57BL/6 c, Immunofluorescenza rappresentativa del segnale per VEGF (verde, sinistra) e macrofagi (esprimenti Mac-3, rosso, centro) nello spazio interstiziale di muscoli adduttori dell'arto ischemico di topi C57BL/6. E' possibile osservare la colocalizzazione dei due segnali (giallo, destra)

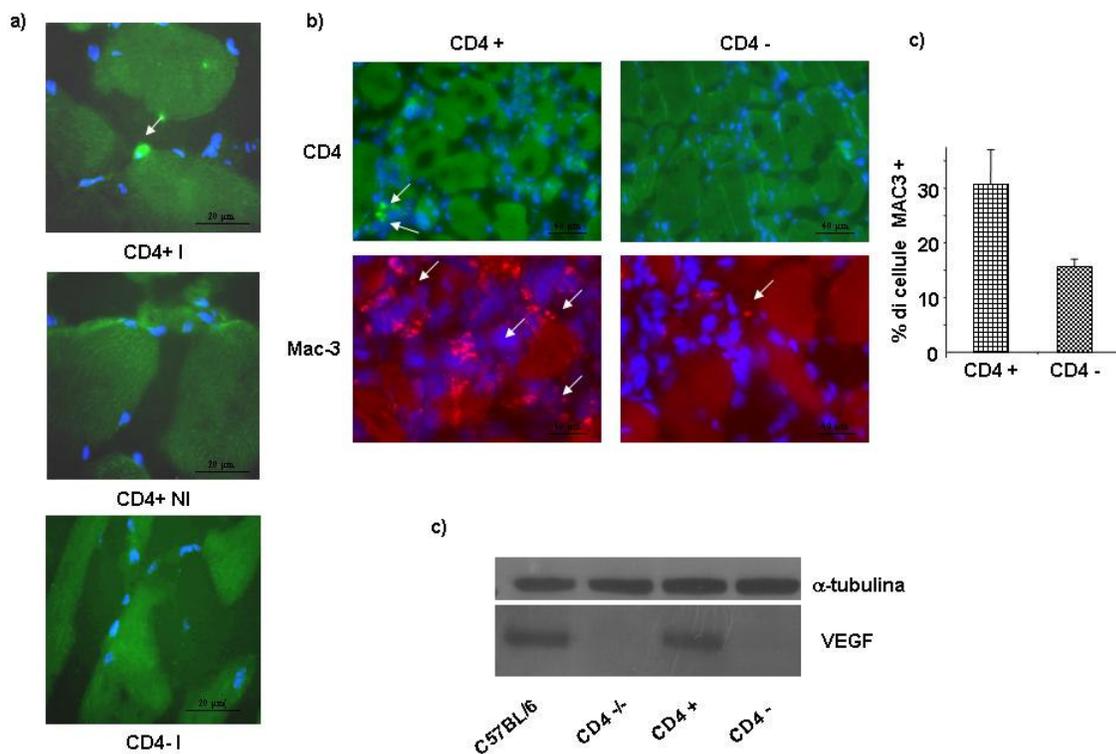


Figure 4. Localizzazione selettiva nell'arto ischemico dei linfociti T CD4 + e recruitment macrofagico in topi CD4 -/- dopo ricostituzione con splenociti CD4+

a, Immunofluorescenza rappresentativa di cellule T CD4 + (sopra) (nuclei colorati in blu, fluorescenza verde per il segnale citosolico) presenti tra le fibre muscolari dei muscoli adduttori dell'arto ischemico (gruppo CD4 +). Non sono evidenti linfociti T esogeni CD4 + T presenti dell'arto degli animali sham (centro). Splenociti esogeni CD4- non sono evidenti evidenti nell'arto ischemico di topi CD4 -/- (gruppo CD4-) (basso). NI = arto non ischemico; I = arto ischemico.

b, Immunofluorescenza di aree di infiltrato infiammatorio dell'arto ischemico 7giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale. Presenza di aree ricche di linfociti T CD4+ (alto, verde, indicati dalle frecce) e di macrofagi (basso, rosso, indicati dalle frecce). c, Il numero di macrofagi infiltranti l'arto ischemico sensibilmente maggiore in topi del gruppo CD4+ rispetto a quello di topi CD4- (*P<0.05). d, Western blot rappresentante l'espressione di VEGF nel muscolo adduttore di topi C57BL/6, CD4 -/-, CD4+ e CD4-.

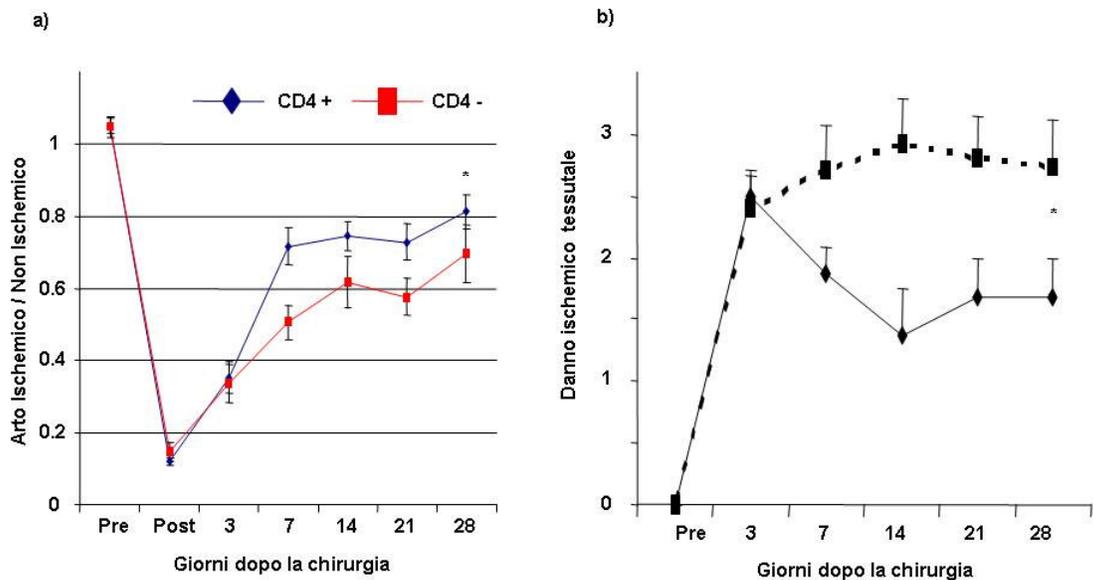


Figure 5. *Recupero del flusso ematico e danno ischemico tessutale dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale in topi CD4^{-/-} dopo infusione di linfociti T CD4⁺.*

a, Perfusione dell'arto ischemico, laser Doppler imaging, in topi CD4^{-/-} dopo infusione di cellule CD4⁺ (gruppo CD4⁺) e CD4⁻ (gruppo CD4⁻).

b, Valutazione semiquantitativa del danno ischemico tessutale dell'arto ischemico in topi del gruppo CD4⁺ (linea continua) e del gruppo CD4⁻ (linea tratteggiata) (*P<0.05).

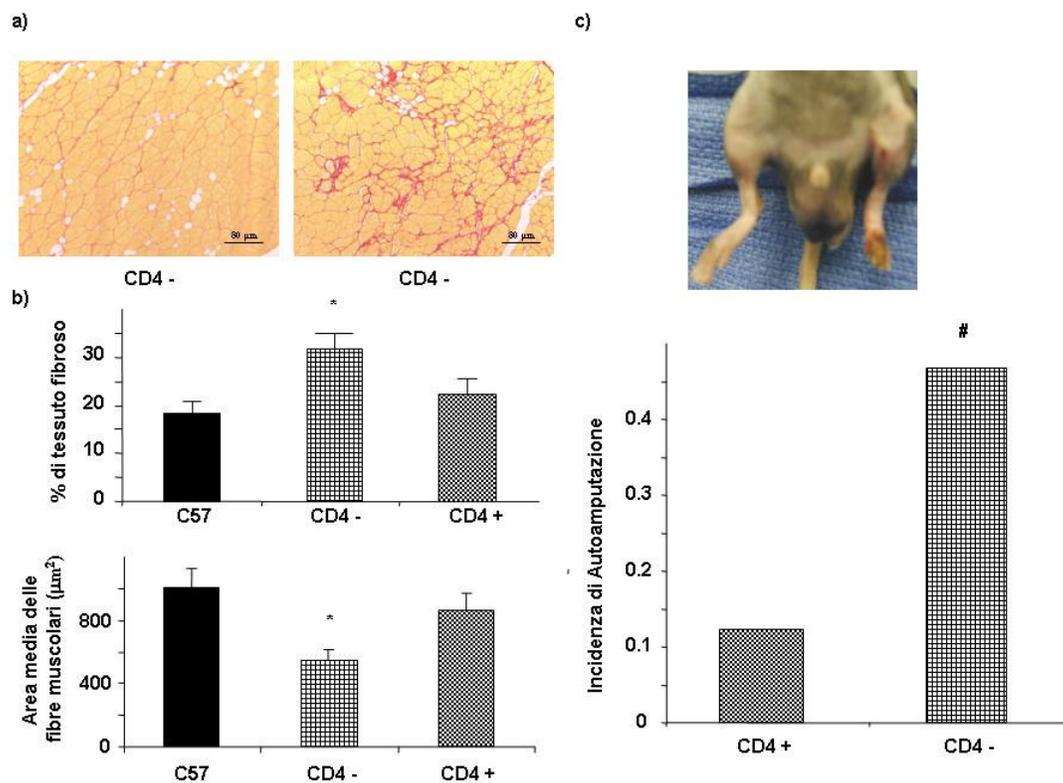


Figure 6. Modifiche istologiche del muscolo gastrocnemio ed incidenza di autoamputazione in topi CD4^{-/-} dopo infusione di linfociti T CD4⁺.

- a. Muscolo Gastrocnemio. Immagini rappresentative di sezioni istologiche colorate con metodica rosso sirio. In rosso sono colorate le fibre collagene ed in giallo le fibre muscolari
- b. Rappresentazione grafica della quantità tessuto fibroso e dell'area media delle fibre muscolari nell'arto ischemico e nell'arto non ischemico dei topi CD4^{-/-} dopo infusione di cellule CD4⁺ (gruppo CD4⁺) e CD4⁻ (gruppo CD4⁻)
- c. Se confrontati con topi dl gruppo CD4⁻, quelli del gruppo CD4⁺ presentavano una minore incidenza di autoamputazione (#P<0.05).

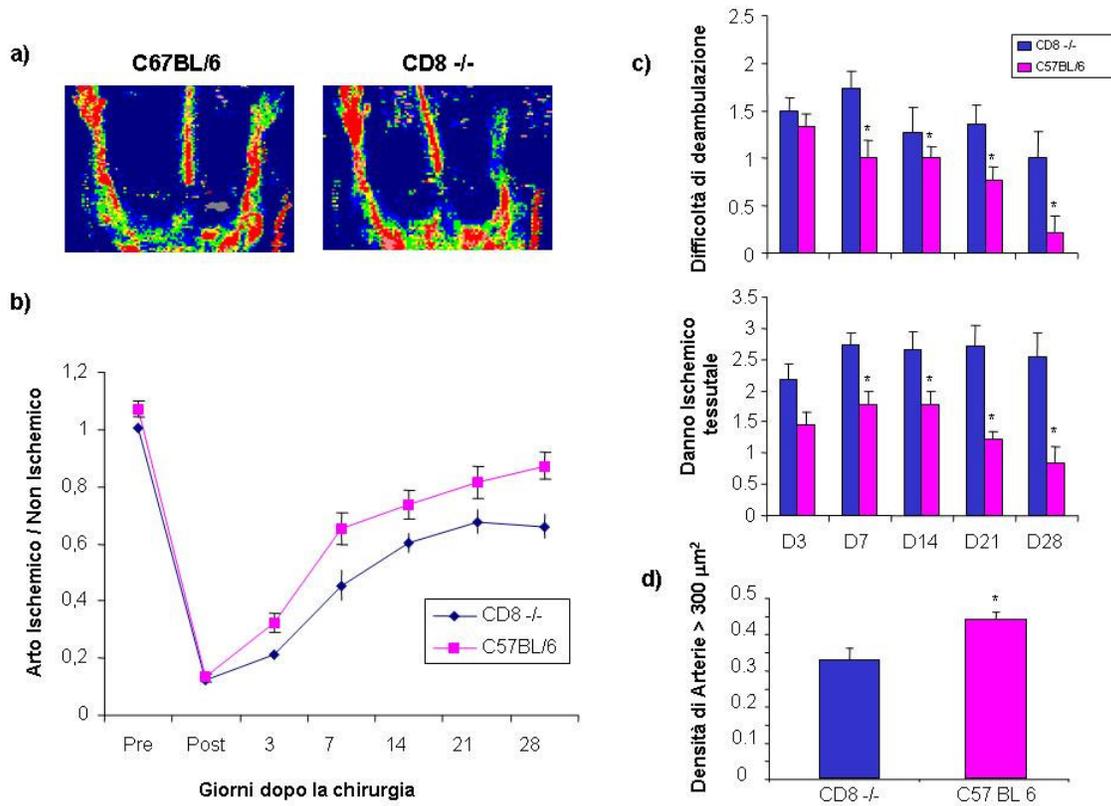


Figura 7. Ridotto sviluppo del circolo collaterale in topi CD8-/- .

a, Immagini rappresentative della velocità di flusso, ematico misurata -/- con metodica laser Doppler imaging, in arti inferiori di topi C57BL/6 e CD8, sette giorni dopo legatura dell'arteria femorale superficiale. Rosso è indice di alta velocità, blu di bassa velocità.

b, Risultati cumulativi, espressi come rapporto tra arto ischemico ed arto non ischemico, del recupero di flusso ematico dopo legatura dell'arteria femorale superficiale in topi C57BL6 (n =14) e topi CD8-/-.

c, Valutazione funzionale del muscolo ischemico durante il follow up. Rappresentazione grafica della difficoltà di deambulazione (sopra) e del danno ischemico tessutale (sotto) (*P=0.05).

d, Densità di vasi collaterali nell'arto prossimale 28 giorni dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale (*P<0.05).

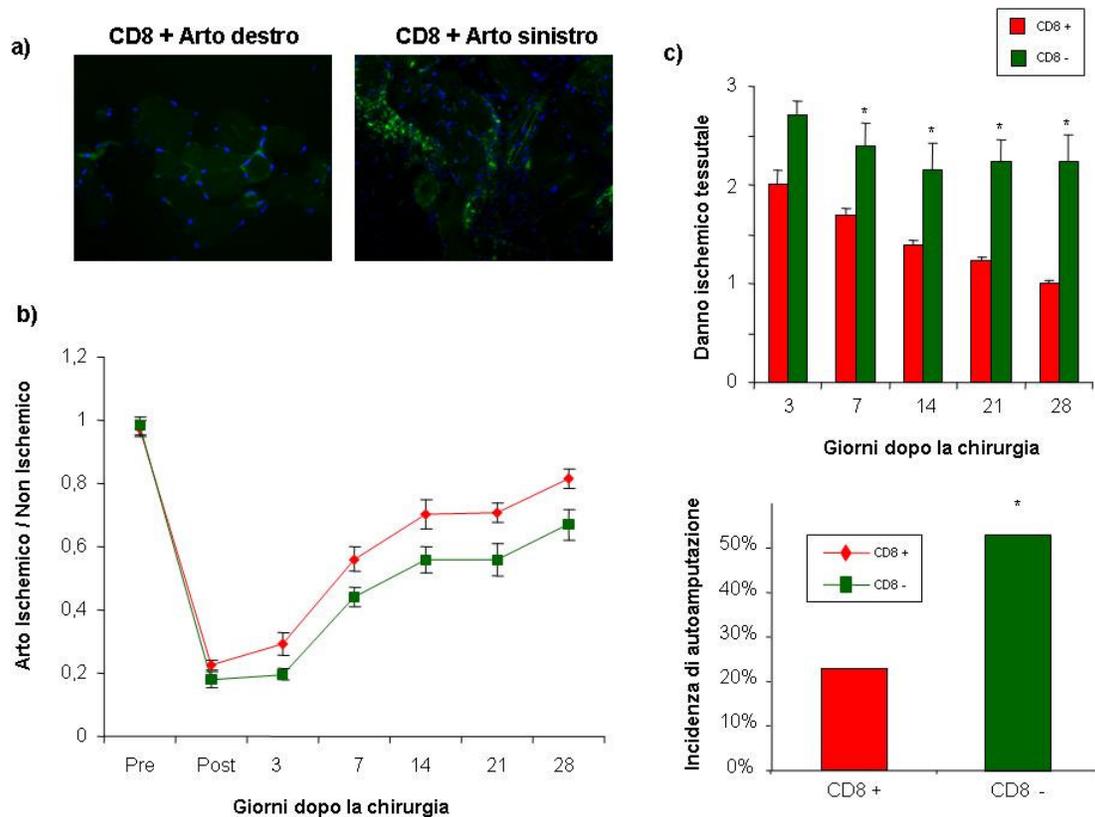


Figure 8. Localizzazione selettiva dei linfociti T CD8+ esogeni, recupero del flusso ematico, riduzione del danno ischemico tessutale e dell'incidenza di autoamputazione dopo infusione in in topi CD8 -/- sottoposti a legatura dell'arteria femorale superficiale.

- a. Immunofluorescenza rappresentativa di linfociti T CD8+ esogeni (nuclei in blu, cellule esogene verde) nell'interstizio di fibre muscolari dell'adduttore dell'arto ischemico (destra). Non sono evidenti cellule esogene nell'arto sham operated (sinistra).
- b. Perfusione dell'arto ischemico, laser Doppler imaging, in topi CD8 -/- dopo infusione di cellule CD8+ (gruppo CD8+) e CD4- (gruppo CD8-).
- c. Valutazione semiquantitativa del danno ischemico tessutale (sopra) dell'arto ischemico in topi del gruppo CD8+ e del gruppo CD8- (*P<0.05). Se confrontati con topi dl gruppo CD8-, quelli del gruppo CD8+ presentavano una minore incidenza di autoamputazione (#P<0.05) (sotto).

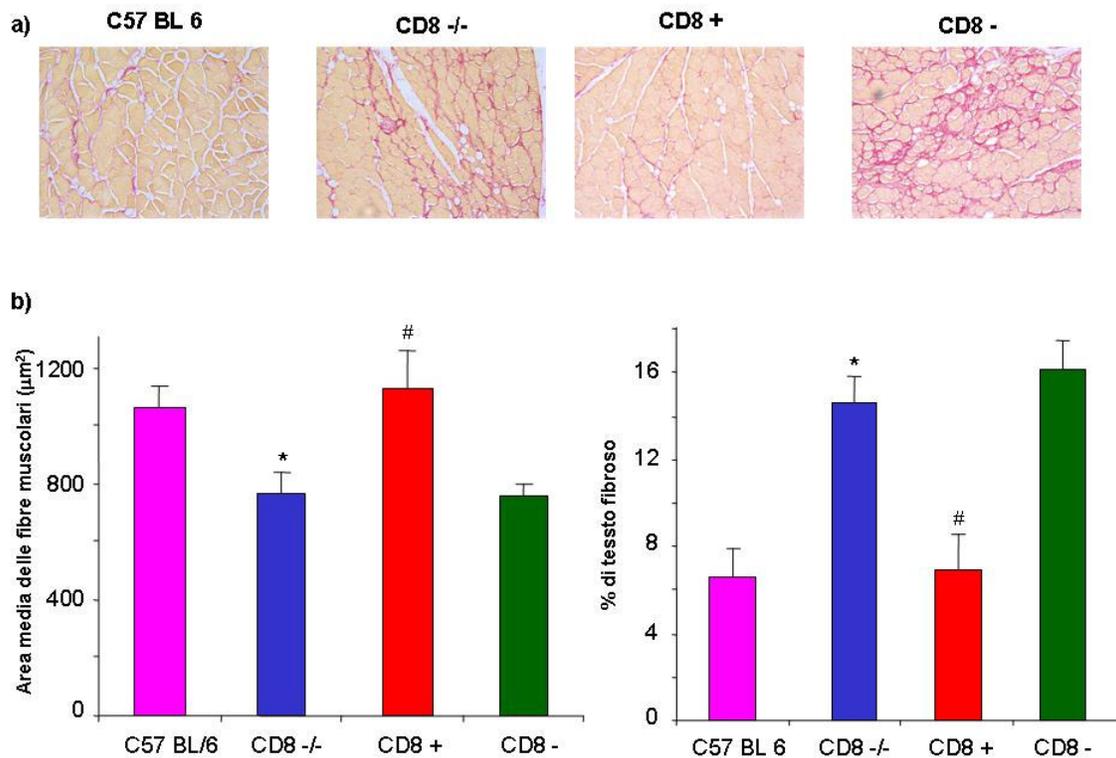


Figure 9. Modifiche strutturali del muscolo gastrocnemio dopo legatura dell'arteria femorale superficiale

a, Muscolo Gastrocnemio. Immagini rappresentative di sezioni istologiche colorate con metodica rosso sirio. In rosso sono colorate le fibre collagene ed in giallo le fibre muscolari

b. Rappresentazione grafica della quantità tessuto fibroso e dell'area media delle fibre muscolari nell'arto ischemico e nell'arto non ischemico dei topi C57BL6, CD8 -/- e CD8 -/- dopo infusione di cellule CD8+ (gruppo CD8+) e CD4- (gruppo CD8-) (*P<0.05).

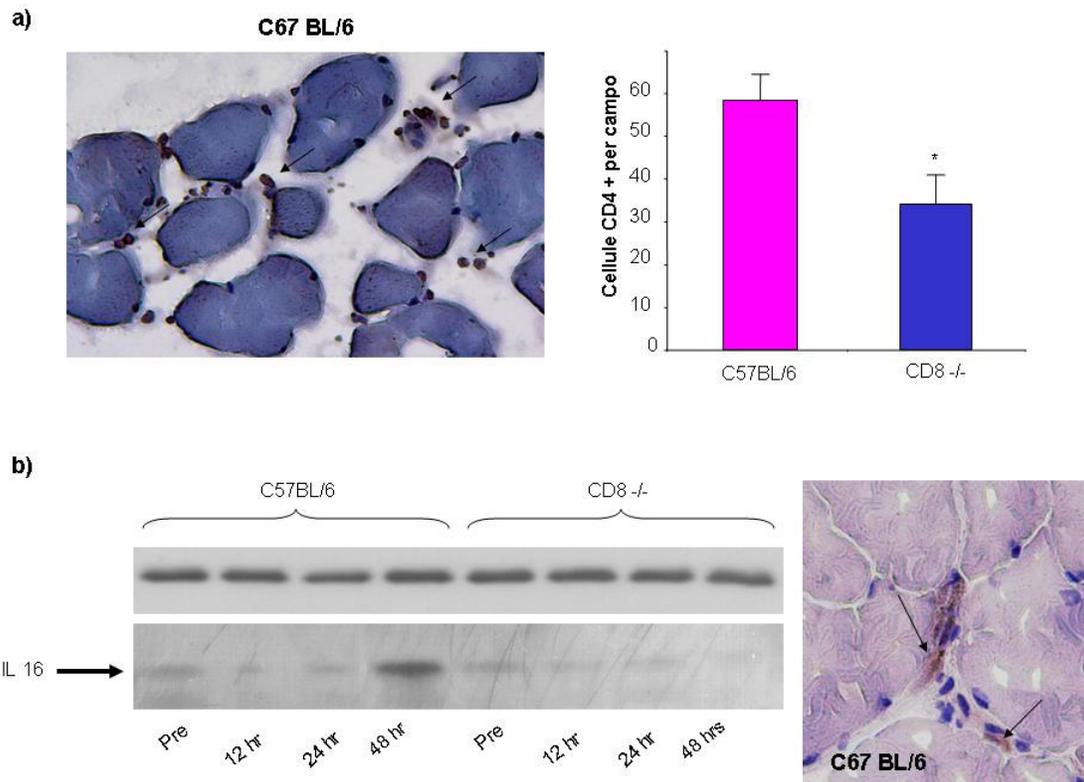


Figure 10. *Infiltrato di linfociti T CD4+ ed espressione di IL-16 dopo ischemia periferica.*

- a. Immunoistochimica rappresentativa della presenza di linfociti T CD4+ nel tessuto interstiziale dei muscoli adduttori 48 ore dopo legatura dell'arteria femorale superficiale (destra), il numero di tali cellule per campo è sensibilmente ridotto in topi CD8^{-/-} (sinistra, *p<0.05)
- b. Western blotting rappresentativo dell'espressione di IL-16 nel muscolo adduttore dopo legatura dell'arteria femorale superficiale in topi C57BL/6 e CD8^{-/-} (sinistra). Immunoistochimica rappresentativa dell'espressione di IL-16 nello spazio interstiziale del muscolo adduttore di topi C57BL/6 48 ore dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale.

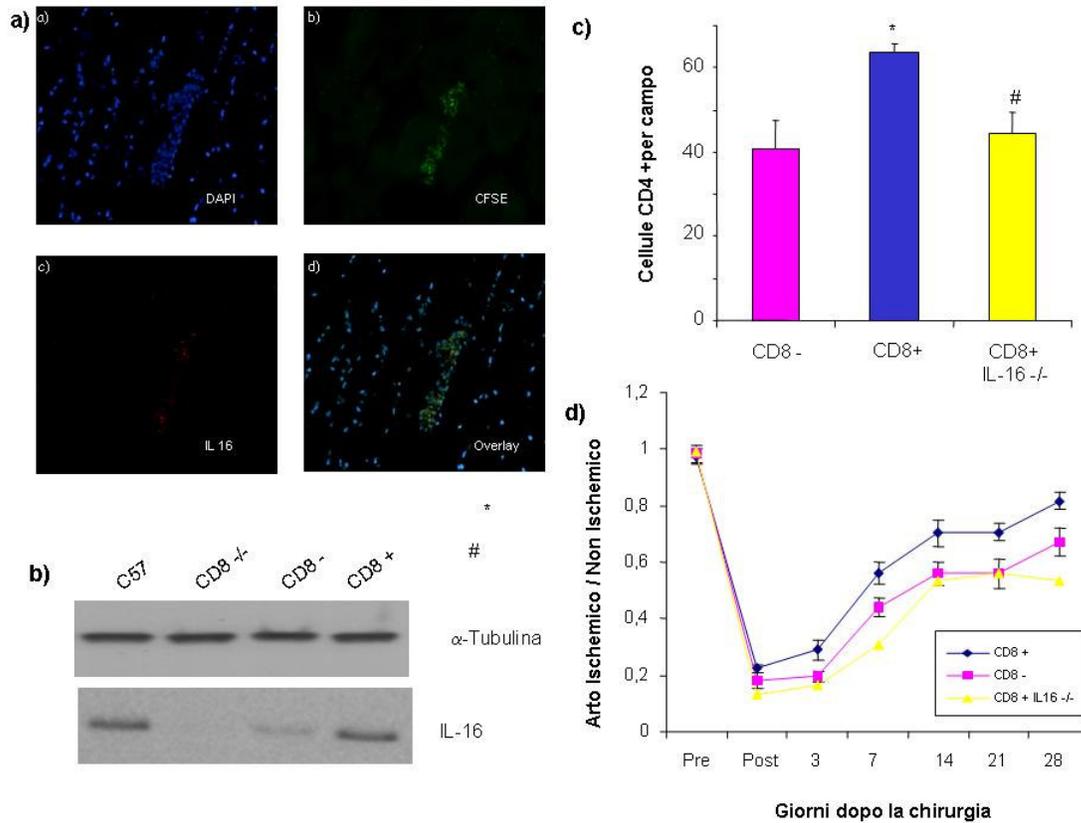


Figure 11. *Espressione di IL16 nell'arto ischemico di topi CD8^{-/-} reconstituiti con linfociti T CD8⁺ e dipendenza dell'incremento dell'infiltrato linfocitario T CD4⁺ e del recupero di flusso ematico dalla capacità di espressione di IL16.*

- a. Immunofluorescenza mostrante (a) nuclei, (b) cellule CD8⁺ esogene, (c) espressione di IL-16, (d) colocalizzazione del segnale
- b, Western blot rappresentante l'espressione di IL-16 nel muscolo adduttore di topi C57BL/6, CD8^{-/-}, CD8⁺ e CD8^{-/-}.
- c) Infiltrato di linfociti T CD4⁺, 48 ore dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, in topi CD8^{-/-}, CD8⁺ e CD8^{-/-} ricostituiti con Linfociti T CD8⁺ IL16^{-/-} (*p<0.05)
- d) recupero del flusso ematico nell'arto ischemico, dopo la legatura dell'arteria femorale superficiale, in topi CD8^{-/-}, CD8⁺ e CD8^{-/-} ricostituiti con Linfociti T CD8⁺ IL16^{-/-} (*p<0.05)