



UNIVERSITA' DI PISA

FACOLTA' DI FARMACIA

Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Indagine immunologica in una coorte di pazienti pediatrici affetti da sindrome di DiGeorge: correlazioni con lo stato vitaminico D

Candidato

Valeria Terranova

Relatori

Prof.ssa Paola Nieri

Prof.ssa Rita Consolini

Dott.ssa Annalisa Legitimo

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Il sistema immunitario	2
1.1.1	Immunità innata e specifica	2
1.1.2	Cellule dendritiche	4
1.1.2.1	Eterogeneità delle cellule dendritiche.....	5
1.1.2.2	Stadi di maturazione	7
1.1.2.3	Induzione della risposta immune	9
1.2	Le immunodeficienze	12
1.3	Sindrome Di DiGeorge.....	14
1.3.1	Storia ed eziopatogenesi.....	14
1.3.2	Il quadro clinico	19
1.3.2.1	Alterazioni immunologiche e patologie autoimmuni	19
1.3.3	Diagnosi e terapia.....	22
1.4	La vitamina D	22
1.4.1	Definizione e struttura chimica	22
1.4.2	Biosintesi.....	24
1.4.3	Metabolismo.....	26
1.4.4	Meccanismo di azione.....	32
1.4.5	Definizione dei livelli sierici di vitamina D.....	34
1.4.6	Fisiologia della vitamina D	34
1.4.6.1	Effetti classici	35
1.4.6.2	Effetti non classici: regolazione della risposta immune	36
1.4.7	Prodotti utilizzabili per la supplementazione con vitamina D	44
2	Materiali e Metodi.....	47
2.1	Soggetti.....	48
2.2	Stato vitaminico D.....	49

2.3	Schema terapeutico.....	49
2.3.1	Gruppo B.....	49
2.3.2	Gruppo C.....	50
2.4	La citofluorimetria.....	50
2.5	Caratterizzazione citofluorimetrica “ex vivo” delle dc mieloidi e plasmacitoidi da sangue periferico	52
2.6	Generazione “in vitro” di cellule dendritiche a partire da monociti circolanti.....	56
2.7	Caratterizzazione fenotipica	60
2.8	Caratterizzazione funzionale: endocitosi recettore mediata di FITC-destrano	62
2.9	Sottopopolazioni linfocitarie T, B, NKT e cellule NK.....	63
2.10	Analisi statistica.....	65
3	Risultati	66
3.1	Cellule dendritiche circolanti	67
3.1.1	Espressione dell’antigene CD85K sulle cellule dendritiche	70
3.1.2	Cellule dendritiche circolanti e 25(OH)D ₃	72
3.2	Sottopopolazioni linfocitarie	75
3.3	Correlazione tra DC e cellule del sistema immune	79
3.4	Supplementazione con vitamina D dei pazienti con livelli di 25(OH)D ₃ inferiori a 20 ng/ml.....	79
3.5	Generazione di cellule dendritiche da monociti	81
4	Discussione	82
5	Bibliografia	90

RIASSUNTO

Introduzione:

La sindrome di DiGeorge (SDG) è causata da una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 22. E' stata inizialmente osservata dall'endocrinologo italo-americano Angelo DiGeorge in un gruppo di bambini che presentavano un quadro clinico comune, caratterizzato da malformazioni cardiache, dismorfismi facciali, convulsioni neonatali dovute ad ipocalcemia conseguente all'ipoparatiroidismo, infezioni ricorrenti dovute all'aplasia del timo e delle paratiroidi. L'ipocalcemia, osservata frequentemente nel periodo neonatale, di solito scompare, ma alcuni bambini possono presentare una persistenza dell'ipoparatiroidismo, che rende necessario un trattamento con calcio e vitamina D. E' anche descritta recentemente un'incrementata incidenza di malattie autoimmuni, la cui eziopatogenesi ad oggi non è acclarata, sembra essere di natura multifattoriale.

Il quadro delle anomalie immunologiche è molto ampio e può variare da un normale profilo immunologico ad una completa assenza di linfociti tale da necessitare di un trapianto di timo o di midollo osseo. A causa di questa variabilità, i pazienti vengono classificati come "SDG completi", quando presentano aplasia timica associata a severa o completa linfopenia T ($\leq 1,5\%$ dei pazienti) e "SDG parziali" quando mostrano invece ipoplasia timica. In questo gruppo di pazienti il difetto immunologico è lieve/moderato e può includere difetti numerici e/o funzionali dei linfociti T, come pure difetti dell'immunità umorale.

Alterazioni quantitative e/o funzionali delle cellule dendritiche (DC) sono state identificate in diverse condizioni patologiche (allergie, patologie autoimmuni, tumori, ecc.) tuttavia il loro coinvolgimento nella SDG non è ancora stato studiato. Le DC per le loro proprietà funzionali svolgono un ruolo fondamentale nella comunicazione tra immunità innata e adattativa. Esse rappresentano la più importante famiglia di cellule presentanti l'antigene, capaci di innescare efficientemente la risposta di cellule T naive, memory ed effettrici; sono inoltre coinvolte nel mantenimento della tolleranza. Le DC circolanti possono essere distinte, sulla base di un diverso profilo fenotipico e

funzionale, in due sottotipi, mieloidi (mDC) e plasmacitoidi (pDC), capaci di esercitare effetti complementari sulle cellule T; infatti, mentre le mDCs sono efficienti APC, le pDC sono implicate nella tolleranza immunitaria.

Recentemente sono stati riconosciuti molteplici effetti extra-scheletrici della vitamina D ed in particolare quelli sul sistema immunitario in considerazione della presenza del suo recettore (VDR) su molte cellule del sistema immunitario (linfociti T attivati CD4 e CD8, linfociti B, neutrofilo, DC, macrofagi).

La 1,25-diidrossivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) agisce sulle cellule T, sia direttamente che indirettamente andando a regolare la produzione di citochine determinanti per il differenziamento linfocitario. Gli effetti inibitori diretti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sono più pronunciati a livello delle cellule T della memoria ed effettrici, in quanto queste cellule hanno un maggior numero di VDR sulla loro superficie rispetto alle cellule naive.

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminuisce la proliferazione, differenziazione e produzione anticorpale dei linfociti B e ne aumenta l'apoptosi.

Relativamente agli effetti sulle DC, studi in vitro hanno dimostrato che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ne inibisce la maturazione e differenziazione, portando alla formazione di cellule coinvolte in meccanismi di tolleranza ed inibendo la formazione di cellule coinvolte in meccanismi di difesa. L'effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ su i due sottotipi di DC (mieloidi e plasmacitoidi) non è equivalente poiché essa regola, in modo preferenziale, il sottotipo delle mDC, con conseguente soppressione dell'attivazione delle cellule T naive.

Numerosi studi hanno riscontrato una correlazione inversa fra i livelli di vitamina D e l'incidenza di alcune malattie come: patologie infettive (tubercolosi, influenza, HIV), malattie autoimmuni (sclerosi multipla, diabete mellito tipo I, malattie reumatiche, psoriasi, malattie infiammatorie croniche intestinali), asma, patologie cardiovascolari e neoplasie.

Scopi dello studio:

Poichè l'immunodeficienza riscontrata nella SDG è causata dall'ipoplasia timica, la maggior parte degli studi ha focalizzato l'attenzione sul numero e funzione dei linfociti T. Tuttavia lo studio di questi parametri dell'immunità cellulo-mediata non si è rivelato esaustivo e non ha permesso di identificare i pazienti con SDG a maggior rischio di sviluppare infezioni severe e/o complicanze autoimmuni. Pertanto questo studio ha avuto come obiettivo un approfondimento di indagine immunologica dei pazienti con SDG, con particolare attenzione alla valutazione delle cellule dendritiche.

In considerazione dei riconosciuti effetti immunomodulanti della vitamina D, la determinazione della vitamina D è stata effettuata in tutta la coorte dei pazienti studiati; essi sono stati inoltre suddivisi in gruppi, sulla base dello stato vitaminico e della presenza di ipoparatiroidismo, al fine di valutare se fosse possibile identificare correlazioni tra livelli sierici di vitamina D e deficit immune.

Infine, il gruppo dei pazienti deficitari è stato sottoposto a supplementazione e successiva rivalutazione immunologica, al fine di evidenziare gli eventuali effetti della vitamina D sul sistema immunitario.

Pazienti e Metodi:

Sono stati inclusi nello studio 12 pazienti affetti da SDG e 12 controlli sani, scelti nella stessa fascia d'età dei pazienti. Tutte le analisi sono state condotte sia considerando i pazienti in toto sia suddividendoli in tre sottogruppi a seconda dello status vitaminico D₃ e della presenza di ipoparatiroidismo. Sono considerati deficitari in vitamina D i soggetti con livelli di 25(OH)D₃ < 20 ng/ml.

Mediante citometria a flusso multiparametrica sono stati enumerati i due subset di cellule DC circolanti, mieloidi (CD14⁻CD16⁻CD85K⁺CD33⁺) e plasmacitoidi (CD14⁻CD16⁻CD85K⁺CD123⁺). Contestualmente è stata esaminata l'espressione dell'antigene CD85K sulle DC, in quanto questo antigene è down regolato in seguito a processi di attivazione ed up regolato nelle DC tolerogeniche.

Additionalmente, sono stati quantizzati i linfociti T, sia CD4⁺ che CD8⁺, con fenotipo naive e memory, i linfociti B, le cellule NK e le cellule NKT.

I pazienti con bassa concentrazione plasmatica di 25(OH)D₃ sono stati supplementati con Vitamina D e le stesse analisi sono state eseguite nel corso del trattamento.

In cinque pazienti è stata inoltre valutata in vitro la capacità dei monociti circolanti di differenziare in DC. Le DC sono state generate a partire da monociti CD14⁺, separati immunomagneticamente, mediante sistema di coltura in presenza di fattori di crescita (GM-CSF e IL-4) per sei-otto giorni.

Risultati:

Lo studio delle componenti del sistema immunitario, mostra una percentuale di linfociti T (CD3⁺) significativamente inferiore nei pazienti rispetto ai controlli. Tale riduzione è significativa nel subset dei linfociti T helper (CD3⁺CD4⁺), ma non nel subset dei linfociti T citotossici (CD3⁺CD8⁺). Inoltre i linfociti T naive (CD45RA⁺CD62L⁺), sia CD4⁺ che CD8⁺, sono significativamente ridotti nei pazienti rispetto ai controlli. Al contrario, i pazienti mostrano valori percentuali di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ con fenotipo memory (cellule effettrici e della memoria centrale), completamente sovrapponibili ai controlli sani.

Valori sovrapponibili ai controlli sono riscontrati per i linfociti B e per le cellule NKT, mentre si osserva un incremento significativo delle cellule NK.

I pazienti considerati nella complessità presentano un numero assoluto di DC circolanti significativamente ridotto rispetto ai controlli sani; tale riduzione coinvolge sia il subset mieloide che plasmacitoide. L'antigene CD85K è maggiormente espresso nei pazienti rispetto ai controlli sani, con differenze significative nel subset mieloide. Inoltre, in tre pazienti, l'antigene CD85K è sovraespresso (maggiore di 2 SD) in entrambi i subset; uno dei tre pazienti presenta patologia autoimmune.

Infine, una moderata correlazione inversa è individuabile tra i linfociti T CD4⁺ con fenotipo naive e il sottotipo mieloide delle cellule dendritiche, mentre nessuna correlazione è presente tra i linfociti con fenotipo memory e le DC.

L'analisi condotta sui pazienti stratificati in 3 gruppi sulla base dello stato vitaminico D e della eventuale presenza di ipoparatiroidismo, ha evidenziato:

- una riduzione dei linfociti T naive in tutti e tre i gruppi di pazienti, con maggiore evidenza nel gruppo con ipoparatiroidismo;
- una riduzione significativa delle mDC rispetto ai controlli nel gruppo dei pazienti con livelli normali di 25(OH)D₃, una riduzione del subset plasmacitoide nei pazienti con ipoparatiroidismo (e pertanto trattati con vitamina D e calcio) e nessuna differenza significativa rispetto ai controlli nel gruppo dei pazienti con livelli bassi di 25(OH)D₃;
- una maggiore espressione dell'antigene CD85K, in entrambi i subset di DC, nel gruppo dei pazienti con ipoparatiroidismo.

Il gruppo dei soggetti sani, utilizzato come controllo, è stato suddiviso in base allo stato vitaminico D. E' interessante notare che nel sottogruppo dei controlli caratterizzati da livelli di 25(OH)D₃ inferiori al range di normalità è presente una riduzione significativa delle pDC rispetto ai soggetti sani con livelli di 25(OH)D₃ normali. Il numero assoluto delle pDC non correla con i livelli di 25(OH)D₃ nel gruppo dei soggetti sani utilizzati come controllo ai pazienti SDG; tuttavia, un ampliamento del gruppo controllo fino a 19 soggetti (età compresa tra 1 e 33 anni), ha permesso di evidenziare una correlazione significativa. Nessuna correlazione è invece riscontrata tra il numero assoluto delle mDC e i livelli di 25(OH)D₃. L'analisi dell'espressione del CD85K mostra inoltre, che livelli più bassi di espressione, sebbene senza differenza significativa, si riscontrano nel gruppo con bassi livelli di 25(OH)D₃.

La capacità dei monociti a differenziare in cellule dendritiche è stata valutata mediante colture in vitro in cinque pazienti. Di questi solo uno mostrava una ridotta capacità generativa. Questo stesso paziente mostra anche un difetto di maturazione. Anche le molecole co-stimolatorie e l'antigene HLADR sono ridotti rispetto ai controlli ed agli altri pazienti con SDG. L'endocitosi di FITC-destrano mostra una lieve riduzione rispetto ai controlli in tutti i pazienti analizzati (n= 4).

Conclusioni:

La letteratura non riporta studi dettagliati sullo stato immune dei pazienti affetti da SDG. Questo studio conferma il deficit di linfociti T e l'aumento di cellule NK, a presumibile significato compensatorio, riportati in letteratura. La nostra indagine evidenzia un difetto numerico delle cellule dendritiche che coinvolge entrambi i subset, mieloide e plasmacitoide. Nel gruppo dei soggetti normali lo stato vitaminico D sembra influenzare il numero di cellule dendritiche circolanti; tale osservazione può almeno parzialmente, essere applicata anche ai pazienti.

La preliminare osservazione dello stato clinico dei pazienti ha evidenziato che il paziente che presenta mDC inferiori a due deviazioni standard rispetto alla media dei controlli ha sviluppato una patologia tumorale e un paziente con elevata espressione dell'antigene CD85K su entrambi i subset, mieloide e plasmacitoide, ha sviluppato patologia autoimmune.

Mentre la letteratura attribuisce il deficit immune dei pazienti con SDG al solo comparto cellulo-mediato, il nostro studio evidenzia il contributo della immunità innata. Un'estensione dello studio ad un gruppo più ampio di pazienti e il follow-up dei parametri immuni, potrebbe aiutare ad identificare un sottogruppo di pazienti con anomalie immunologiche e quindi a più alto rischio di sviluppare malattie autoimmuni, infettive e tumorali. Il ristretto numero di pazienti trattati con vitamina D non ha permesso di stabilirne la potenzialità immunomodulante.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO

Il sistema immunitario ha il compito di mantenere, preservare e ripristinare l'integrità dell'organismo in seguito all'attacco di agenti esterni. Inoltre ha anche un ruolo nel mantenere sotto controllo componenti dell'organismo stesso alterate o anormali. Storicamente è stato diviso in due categorie principali: immunità innata e immunità acquisita.

1.1.1 Immunità innata e specifica

L'immunità innata rappresenta il sistema di difesa filogeneticamente più antico e consiste in una serie di meccanismi cellulari e biochimici, preesistenti all'infezione e capaci di agire rapidamente. Questi meccanismi agiscono solo nei confronti dei microbi e lo fanno in modo identico ed aspecifico a infezioni ripetute. E' un sistema di difesa immediato ma privo di memoria.

I principali componenti dell'immunità innata sono: le barriere fisiche e chimiche, come gli epitelii e le sostanze antimicrobiche prodotte dalle superfici epiteliali; le cellule fagocitiche (neutrofili e macrofagi) e le cellule natural killer (NK); il sistema del complemento e le citochine: proteine capaci di regolare e coordinare molte attività delle cellule dell'immunità innata [1].

L'immunità acquisita è caratterizzata invece da una risposta antigene-specifica, che abitualmente impiega diversi giorni per organizzarsi, ma che alla successiva esposizione allo stesso antigene, diventa più veloce e spesso più efficace, essendo dotata della cosiddetta "memoria" per l'antigene stimolante. Esistono due tipi di risposta immunitaria adattativa: l'immunità umorale e l'immunità cellulare. Esse sono mediate da componenti diversi del sistema immunitario e hanno il compito di eliminare tipi diversi di microorganismi [1].

L'immunità umorale è mediata dai linfociti B, che riconoscono gli antigeni extracellulari e si differenziano in plasmacellule capaci di secernere anticorpi; questi sono proteine globulari che non distruggono direttamente l'ospite estraneo, ma si legano

ad esso per renderlo maggiormente suscettibile all'azione di fagociti e cellule citotossiche.

L'immunità cellulare è mediata invece dai linfociti T, generati a partire da cellule staminali del midollo osseo, che migrano e maturano nel timo; sono deputati alla protezione dalle infezioni provocate da microbi intracellulari. I linfociti T possono essere distinti, sulla base dell'espressione di molecole di superficie, chiamate CD (Cluster of Differentiation) e identificate mediante una numerazione progressiva, in sottopopolazioni funzionalmente diverse: i linfociti citotossici (Tc) $CD3^+CD8^+$ e i linfociti helper (Th) $CD3^+CD4^+$. I linfociti Tc agiscono uccidendo le cellule che producono antigeni non-self, mentre le cellule Th, in risposta ad un'infezione, secernendo citochine che servono a stimolare la proliferazione e la differenziazione delle stesse cellule T e l'attivazione di altre cellule, tra cui cellule B, macrofagi ed altri leucociti [1]. I linfociti T $\gamma\delta$ sono un subset di cellule T definito dalla composizione genetica del loro recettore cellulare (T cell receptor: TCR). Tutte le cellule T derivano da progenitori timocitari comuni e mentre la maggior parte delle cellule T esprime catene del TCR codificate dai loci genetici α e β , le cellule T $\gamma\delta$ esprimono TCR con catene codificate dai loci genetici γ e δ . Diversamente dalle cellule T $\alpha\beta$ non esprimono gli antigeni CD4 e CD8 (hanno un fenotipo $CD3^+CD4^-CD8^-$). Queste cellule rappresentano una piccola percentuale (1-5%) delle cellule linfocitarie T totali del sangue periferico, ma sono più abbondanti nei compartimenti ricchi di cellule epiteliali, come la pelle, nel tratto digestivo e nella mucosa degli organi riproduttivi. Le cellule T $\gamma\delta$ sono state descritte come un legame tra le risposte immuni innate e adattative. Esse sembrano rispondere a piccoli antigeni fosforici, espressi da alcuni organismi potenzialmente patogeni, tra cui l'isopentenilpirofosfato (IPP). La loro attivazione porta alla rapida produzione di citochine e chemochine, coinvolte nelle risposte infiammatorie e immunitarie, così come nella generazione di cellule T con attività citotossica. I linfociti $\gamma\delta$, oltre a svolgere un importante effetto protettivo nei confronti di infezioni batteriche, in particolare micobatteriche e nelle neoplasie, possono essere coinvolti nella patogenesi di malattie distruttive infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla, nelle quali si pensa svolgano un ruolo critico citochine infiammatorie e fattori citotossici [1].

Poiché i linfociti T riconoscono solo antigeni peptidici attaccati a proteine codificate dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), è necessario che l'antigene sia catturato, elaborato e presentato ai linfociti stessi, da parte di cellule specializzate, le cellule presentanti l'antigene (APC). Le APC più specializzate in questa funzione sono le cellule dendritiche.

1.1.2 Cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) sono state identificate per la prima volta nel 1968, quando vennero visualizzate come cellule di Langerhans nella pelle. Nonostante si fosse già capito che queste "cellule accessorie" potessero avere un ruolo nel generare la risposta anticorpale, fu solo nel 1973, quando Steinman ed i suoi collaboratori le isolarono dal tessuto della milza di topo e le caratterizzarono, che divenne chiara la loro funzione [2, 3].

Le cellule dendritiche sono le più potenti cellule presentanti l'antigene e per questo vengono considerate le cellule maggiormente coinvolte nell'induzione e nella modulazione della risposta immunitaria [4]. Sia la tolleranza immunitaria nei confronti del "self" che l'attivazione contro i patogeni, sono il risultato di meccanismi di processazione antigenica simili, ma non identici, operati delle DC. Queste cellule infatti, sono capaci di processare gli antigeni provenienti da patogeni e da cellule apoptotiche e presentarli, in presenza di MHC specifici, alle cellule T naive nella milza e nei linfonodi. La finalità di questa presentazione però varia in base alle molecole costimolatorie che prendono parte al processo. Infatti, gli antigeni provenienti da microorganismi esterni o da cellule infettate, stimolano la produzione di una serie di molecole proprie dell'immunità innata e capaci di indurre una potente attivazione delle risposte specifiche B e T. Gli antigeni derivati da cellule apoptotiche invece, in assenza di segnali costimolatori da parte dell'immunità innata, inducono cellule T regolatorie capaci di sopprimere l'autoimmunità [5].

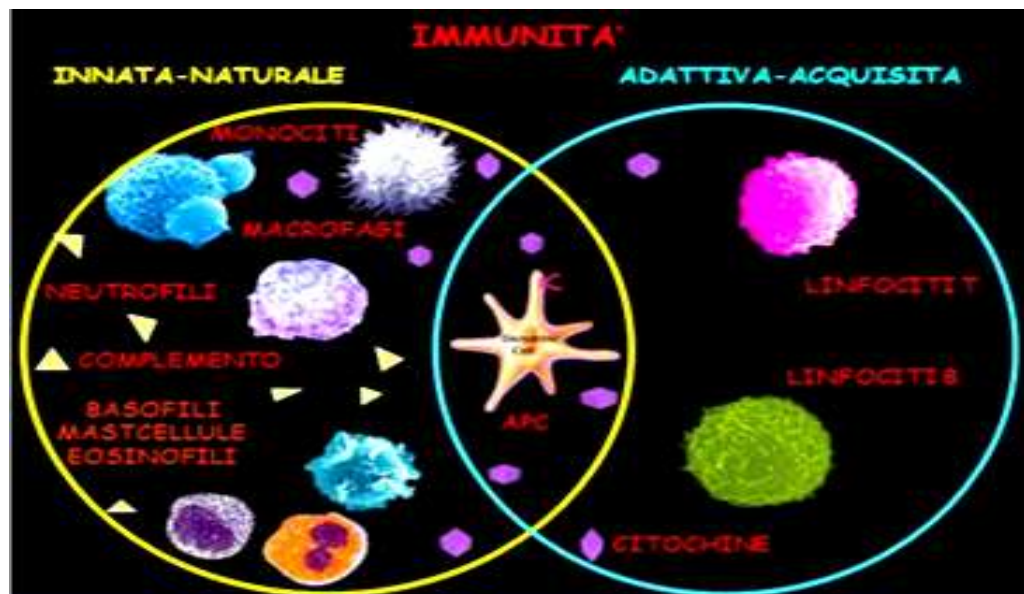


Figura 1. DC tra immunità innata e adattiva

Le DC sono una sottopopolazione eterogenea di leucociti, morfologicamente caratterizzate dalla presenza di numerosi e sottili processi citoplasmatici, che conferiscono loro un aspetto simile ad un albero (dal greco “δεντρο”: albero) [6]. Esse appaiono come cellule metabolicamente attive con mitocondri dispersi, apparato di Golgi riconoscibile, alcuni lisosomi, fagolisosomi, goccioline lipidiche, e un reticolo endoplasmatico ben sviluppato; sono provviste di un grande nucleo, con numerose dentature e con eterocromatina generalmente depositata a livello della membrana nucleare [7].

1.1.2.1 *Eterogeneità delle cellule dendritiche*

Si riteneva che le cellule dendritiche si trovassero soltanto nei follicoli dei linfonodi (cellule follicolari dendritiche) e nell'area paracorticale del linfonodo (cellule dendritiche interdigitate). In realtà la loro presenza è stata dimostrata anche in altri tessuti ed in particolare nei tessuti in contatto con l'ambiente esterno quali cute e mucose. Specificamente, queste cellule sono state identificate nell'epitelio tracheo-

bronchiale e nei setti interalveolari e nel tessuto connettivo peribronchiale e peribronchiolare dove arrivano provenienti dai vasi.

Le DC vengono classificate in base alla funzione e alla localizzazione in cellule dendritiche del sangue [8], dei tessuti (che includono le cellule Langerhans cutanee) [9], delle vie respiratorie [10, 11, 12, 13], della mucosa del tratto digestivo [14, 15, 16], cellule interdigitate nel derma, della lamina propria della mucosa [17] e della sottomucosa [13, 18], cellule a vela dei linfatici afferenti [19], cellule interdigitate dei linfonodi regionali [19] e delle strutture linfoidi attorno alle mucose [17, 20], cellule interstiziali di organi come rene, intestino, polmone, tiroide [21].

Nonostante rappresentino una popolazione estremamente eterogenea, le DC circolanti possono essere divise in due grandi gruppi, aventi origine, caratteristiche e funzioni differenti: le cellule dendritiche mieloidi (mDC) e plasmacitoidi (pDC) [22].

Le mDC hanno origine monocito-macrofagica e morfologia simile ai monociti. Nell'uomo, le mDC sono identificate come negative per i markers specifici di linea (CD3, CD14, CD19, CD20, CD34 e CD56) e positive per gli antigeni mieloidi CD1c (BDCA-1), CD13, CD33 e CD11c. In condizioni fisiologiche, le mDC risiedono nei tessuti periferici dove operano il controllo del microambiente per l'ingresso di antigeni patogeni. La loro attivazione, innescata da una varietà di fattori (citochine proinfiammatorie come il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) o derivati di patogeni come il lipopolisaccaride (LPS)) e dall'interazione CD40/CD40L, porta al rilascio di elevati livelli di interleuchina 12 (IL-12) e all'induzione del differenziamento dei linfociti T in cellule T helper di Tipo 1 (Th1) effettrici [23, 24].

Le pDC sono un raro sottoinsieme di cellule di origine linfoide, presenti in circolo e negli organi linfoidi secondari. Sono cellule caratterizzate dall'assenza degli antigeni di linea CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD34, CD56 e dalla presenza delle molecole BDCA-2 (CD303), BDCA-4 (neuropilina-1/CD304) e del recettore dell'IL3 (IL3R/CD123). Secernono alti livelli di interferone (IFN)- α e questo gioca un ruolo cruciale nella risposta immunitaria anti-virale e nell'attivazione di cellule natural killer (NK) [25]. Inoltre le pDC, attraverso la produzione di IFN- α e di IL-6, inducono i linfociti B a differenziarsi in plasmacellule ed a produrre preferenzialmente immunoglobuline di tipo G (IgG) piuttosto che di tipo M (IgM). E' stato ipotizzato

pertanto che le pDC possano agire specificatamente sui linfociti B di memoria, poiché le IgG sono responsabili della risposta anticorpale secondaria, successiva, ma più veloce della risposta anticorpale primaria dovuta alle IgM [26]. Le pDC sono normalmente assenti nei tessuti periferici e si ritiene migrino dal sangue ai linfonodi tramite le venule endoteliali; tale migrazione è mediata dalla L-selectina ed è aumentata, tramite un meccanismo dipendente dalla E-selectina, quando i linfonodi sono esposti a condizioni infiammatorie. Possono indurre il differenziamento dei linfociti T in cellule T helper di Tipo 2 (Th2) secernenti le citochine IL-4 ed IL-10.

1.1.2.2 *Stadi di maturazione*

Le DC, sia mieloidi che plasmacitoidi, esistono principalmente in due stadi di sviluppo, caratterizzati da proprietà fenotipiche e funzionali distinte. Si parla, infatti, di DC immature attive soprattutto nel processo di cattura e processazione dell'antigene e di DC mature che invece sono abili nella presentazione dell'antigene ai linfociti T naive [27-29].

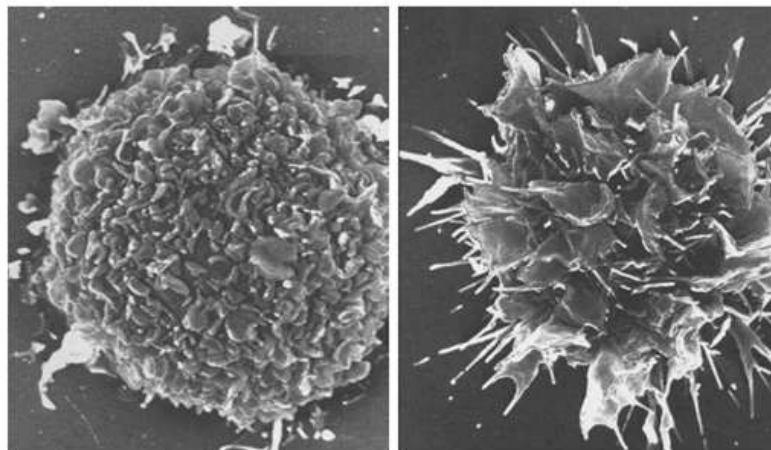


Figura 2. Cellule Dendritiche (da Steinman R., 2007)
Immagine di una cellula dendritica immatura (a sinistra) e matura (a destra).

Le DC si trovano nei tessuti periferici nello stato immaturo e sono incapaci di attivare i linfociti T poiché mancano di tutti i segnali di membrana necessari per la loro attivazione. A questo livello differenziativo, tuttavia, le DC sono estremamente efficienti nella cattura e nella endocitosi dei patogeni e dei loro prodotti (LPS, sequenze CpG, DNA, Heat Shock Proteins, ecc.) e sono caratterizzate, dal punto di vista fenotipico, da una bassa espressione di MHC I e II e di molecole costimolatorie CD40, CD80, CD86.

Le DC riconoscono gli antigeni attraverso pattern molecolari conservati associati ai patogeni (PAMP). Attualmente si conoscono almeno quattro famiglie di recettori PAMP: i recettori Toll-like (TLR), i recettori C-type lectin (CLR), i recettori intracitoplasmatici NOD-like (NLR) e i recettori intracellulari gene I-like acido retinoico-inducibili. Ulteriori segnali attivanti riconosciuti dalle DC possono derivare da cellule necrotiche, apoptotiche o sottoposte a stress elevati [29, 30]

Una volta riconosciuto, l'antigene viene catturato attraverso tre diversi meccanismi: endocitosi specializzata, fagocitosi e macropinocitosi [31-33, 5]. L'endocitosi specializzata consente la captazione di macromolecole a livello di fossette rivestite della membrana plasmatica con formazione di vescicole endocitiche. E' un processo in cui diversi recettori mediano la captazione dell'antigene. La fagocitosi e la macropinocitosi sono processi che richiedono invaginazioni di membrana con formazione di larghi vacuoli. La fagocitosi è un meccanismo utilizzato per inglobare antigeni corpuscolati, mentre la macropinocitosi consente l'internalizzazione di antigeni solubili.

A questo punto l'antigene viene internalizzato e processato, al fine di ottenere dei peptidi che verranno poi caricati su molecole MHC ed esposti in superficie.

La cattura dell'antigene induce le DC a migrare dalla periferia ai linfonodi. Durante la migrazione, le DC subiscono un processo di maturazione, che le porta ad incrementare enormemente la propria capacità di attivare le cellule T. Al termine del processo maturativo ci troviamo di fronte un diverso fenotipo di DC che presenta livelli 50 volte maggiori di molecole dell'MHC rispetto ai macrofagi e fornisce un maggiore rapporto peptide/ligando. Inoltre, le DC mature sono caratterizzate da elevata espressione di molecole costimolatorie (CD80, CD86, CD40, CD54, B7h, 4-1BB) e di

altre molecole accessorie (DC-SIGN, LFA e TRANCE), che inducono l'attivazione dei linfociti T naive e la loro differenziazione ed espansione in cellule T effettrici [34-36].

1.1.2.3 *Induzione della risposta immune*

Nelle aree a cellule T degli organi linfoidi, le DC attivate presentano l'antigene processato, in forma di complessi MHC-peptide, ai linfociti T naive responsivi. Questa presentazione, indispensabile per l'innesco della risposta immune, richiede un contatto tra le cellule coinvolte che si esplica nella formazione della cosiddetta sinapsi immunologica. La struttura della sinapsi coinvolge, sulle DC, i complessi MHC-peptide, alcune molecole di adesione come la DC-SIGN e l'intercellular adhesion molecule (ICAM)-1/2, nonché molecole di co-attivazione come B7-1 e B7-2. I linfociti T, invece, vedono impegnati i complessi T cell receptor (TCR)/CD3 (per il riconoscimento dell'antigene), le molecole d'adesione lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 (ligando di ICAM-1 e ICAM-2) e ICAM-3 (ligando di DC-SIGN), molecole di co-attivazione come il CD28 (ligando di B7-1 e B7-2), il CD4 (ligando della porzione non polimorfica delle molecole MHC di classe II) o il CD8 (ligando della porzione non polimorfica delle molecole MHC di classe I), la fosfatasi CD45 (RA/RO). Inoltre, sia nelle DC che nei linfociti T vengono coinvolti vari componenti citoscheletrici [37, 38].

In seguito ad attivazione, i linfociti T producono IL-2 e vanno incontro ad una rapida proliferazione differenziando in cellule effettrici ($CD4/CD8^+CD62L^-CD45RA^+$) oppure in cellule di memoria ($CD4/CD8^+CD62L^+CD45RA^-$), capaci di rispondere prontamente ad una successiva stimolazione.

Nel caso dei linfociti T $CD4^+$, è possibile distinguere vari sottotipi di cellule effettrici: le Th1, le Th2, le Th17 e le T regolatorie (Treg) (Figura 3) [1, 5].

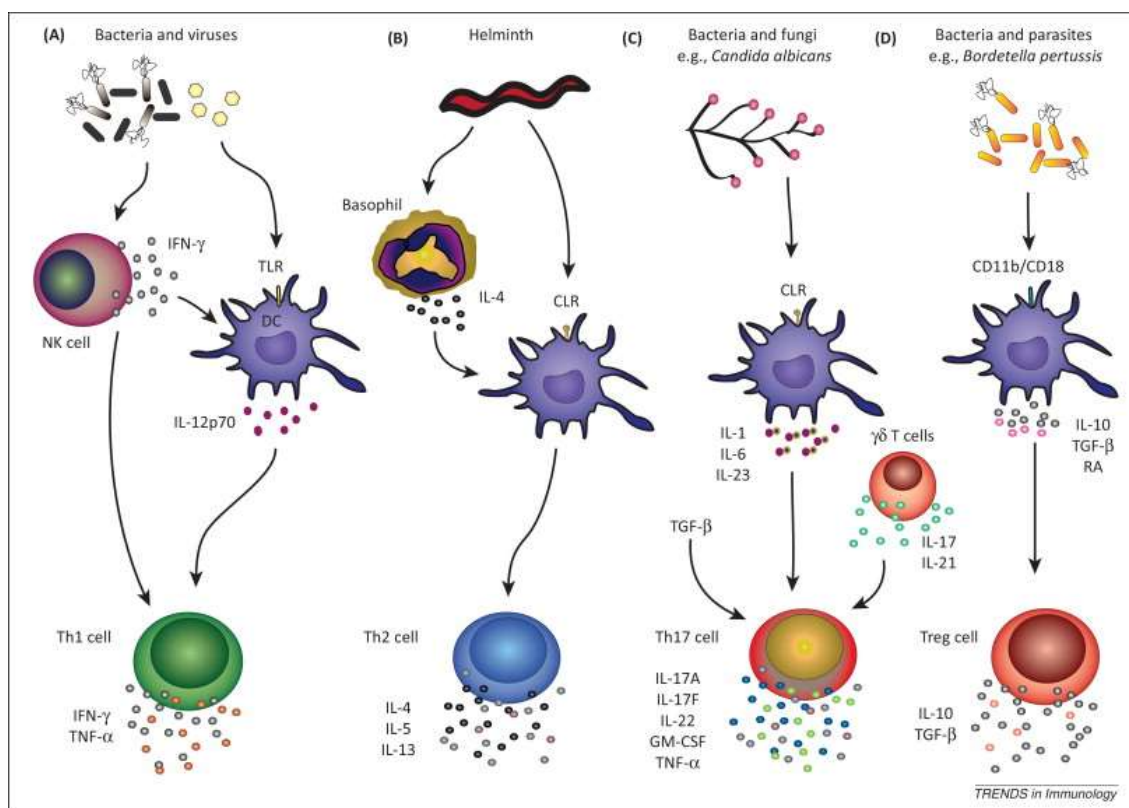


Figura 3. Interazione tra le DC ed i Linfociti T (da Walsh et al 2013 [5]).

I patogeni dirigono la polarizzazione della risposta cellulare T attraverso effetti distinti sulle cellule dell'immunità innata, in particolare sulle DC.

La polarizzazione a cellule Th1 è indotta da IFN- γ e IL-12 e soppressa da IL-4; le cellule Th1 producono principalmente IL-2, IL-3, TNF- α e IFN- γ e sono i principali regolatori della risposta cellulo-mediata volta a distruggere cellule tumorali o patogeni intracellulari (come virus e alcuni batteri). Infatti esse adjuvono le funzioni macrofagiche, sia producendo IFN- γ che attiva i macrofagi e ne potenzia le capacità antimicrobiche, sia stimolando i linfociti B a produrre anticorpi IgG1 e IgG3, opsonizzanti e fissanti il complemento, che facilitano la fagocitosi dei patogeni extracellulari. Le cellule Th1 sono coinvolte nello sviluppo di patologie autoimmuni e nelle reazioni di ipersensibilità ritardata [1].

La polarizzazione a cellule Th2 è indotta da IL-4 e soppressa da IFN- γ e IL-12; le cellule Th1 producono principalmente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e sono i principali

regolatori della risposte umorali volte a distruggere patogeni extracellulari. Infatti esse stimolano i linfociti B a produrre anticorpi neutralizzanti o in grado di attivare il complemento o di indurre la degranulazione di mastociti ed eosinofili. Alterazioni della risposta Th2 conducono allo sviluppo di patologie allergiche [1].

Le cellule Th17 rappresentano una sottopopolazione identificata più recentemente [39- 41]; il loro sviluppo è indotto dal fattore β di crescita tumorale (TGF- β) e dall'IL-6 [41], stabilizzato e amplificato da IL-23 e inibito da IL-4 e IFN- γ [43]. Sono la principale fonte di produzione di IL-17, un potente mediatore infiammatorio, ma secernono anche IL-22, IL-6 e TNF- α [44]. I linfociti Th17 attivano le cellule coinvolte nella distruzione di batteri extracellulari e nell'infiammazione cronica [45]; essi sono inoltre implicati nella patogenesi di malattie autoimmuni, come sclerosi multipla e psoriasi.

Le cellule Treg hanno origine nel timo da cellule CD4⁺ che esprimono costitutivamente l'antigene di superficie CD25, il recettore ad alta affinità per la catena α dell'IL-2. E' stato dimostrato che queste cellule svolgono un ruolo importante nella tolleranza e nello sviluppo della patologia autoimmune [45, 5].

La capacità delle DC di orientare la risposta T cellulare è legata a diversi fattori quali:

- Tipo di stimolo cui sono sottoposte (es: CD40L, INF- γ , LPS stimolano DC secernenti IL-12 inducendo una risposta Th1, mentre TGF- β , IL-1, TNF- α inducono DC non secernenti IL-12 con conseguente risposta Th2);
- Segnali derivati da patogeni (sono in grado di influenzare la secrezione citochinica delle DC, come schematizzato in Figura 3);
- Fattori tessuto specifici (partecipano alla differenziazione fenotipica delle DC);
- Rapporto DC/cellule T o durata della stimolazione (in grado di polarizzare la risposta delle cellule T).

La tolleranza periferica viene avviata in seguito all'intervento di DC definite "immunologic self", le quali, nello steady state, in assenza di stimoli infiammatori, entrano nei linfonodi regionali, nello stato "immaturo" o "semi-maturo", dove

presentano gli antigeni self raccolti in periferia. La delezione dei linfociti T self-reattivi può avvenire direttamente, per induzione di apoptosi da parte delle DC tollerogeniche, o indirettamente, mediante l'induzione di cellule T regolatorie antigene-specifiche.

1.2 LE IMMUNODEFICIENZE

Quando il sistema immunitario non è più in grado di assolvere, del tutto o in parte, il proprio compito, si instaurano quadri patologici complessi, definiti, nel loro insieme, immunodeficienze (ID). La maggior parte delle ID si accompagna ad un'aumentata suscettibilità alle infezioni e ad un'aumentata incidenza di neoplasie e di malattie autoimmuni.

Le immunodeficienze vengono classicamente distinte in congenite (o primitive) ed acquisite (o secondarie). Questa distinzione si basa su una diversità patogenetica: le prime sono causate da difetti che interessano primitivamente ed elettivamente il sistema immunitario, mentre nelle seconde, un processo morboso di diversa natura, conduce solo secondariamente al difetto del sistema immunitario [47, 48].

Le immunodeficienze primitive (IDP) costituiscono un insieme eterogeneo di malattie geneticamente determinate, caratterizzate da difetti congeniti nella differenziazione e/o funzione del sistema immunitario. Considerate singolarmente, le varie sindromi da immunodeficienza primitiva si riscontrano raramente nella pratica clinica; nel loro insieme, tuttavia, esse non sono eccezionali, verificandosi nello 0,6% di tutti i nati vivi. Il loro numero è considerevolmente aumentato negli ultimi anni, grazie all'apporto dell'immunologia e della biologia molecolare [48].

Sulla base della componente del sistema immunitario che risulta coinvolta, le IDP vengono classificate, secondo la classificazione OMS (Figura 4) in:

- 1) IDP da difetti dei linfociti B o IDP anticorpali. Si manifestano con un'abnorme suscettibilità alle infezioni da agenti patogeni piogeni a invasività extracellulare.
- 2) IDP da difetti dei linfociti T. Sono caratterizzate da elevata suscettibilità alle infezioni da germi a invasività intracellulare; inoltre, poiché i T linfociti cooperano con i linfociti B nella risposta anticorpale, predispongono anche ad infezioni da germi extracellulari

- 3) ID da difetti del complemento (molto rare) .
- 4) ID da difetti dei fagociti. Caratterizzate da frequenti e gravi infezioni batteriche e fungine.
- 5) ID associate a sindromi. Sono malattie in cui sono coinvolti anche altri organi oltre al sistema immunitario.

Principali Immunodeficienze Primitive (Classificazione OMS)
<p>Difetti dell'Immunità Specifica</p> <p>Difetti prevalentemente anticorpali (linfociti B)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agammaglobulinemia Congenita Legata al Sesso (M. di Bruton)* • Immunodeficienza Comune Variabile* • Difetti di Sottoclassi IgG • Difetto di IgA* • Ipogammaglobulinemia Transitoria dell'Infanzia <p>Difetti prevalentemente cellulari (linfociti T)**</p> <ul style="list-style-type: none"> • Immunodeficienza Combinata Grave (SCID) <p>Immunodeficienze con sindromi multisistemiche***</p> <ul style="list-style-type: none"> • Candidiasi Cronica Mucocutanea • Atassia-Telangiectasia • Sindrome di Di George • Sindrome di Wiskott-Aldrich
<p>Difetti dell'immunità non-specifica****</p> <ul style="list-style-type: none"> • Difetti funzionali dei fagociti • Difetti di frazioni del complemento

Figura 4. Principali immunodeficienze primitive secondo la classificazione dell'OMS

1.3 SINDROME DI DIGEORGE

1.3.1 Storia ed eziopatogenesi

Nel 1968 l'endocrinologo italo-americano Angelo DiGeorge descrisse un gruppo di bambini che presentavano un quadro clinico comune, caratterizzato da malformazioni cardiache, convulsioni neonatali dovute ad ipocalcemia conseguente all'ipoparatiroidismo, infezioni ricorrenti dovute all'aplasia del timo e delle paratiroidi e dismorfismi facciali [49]. Nel 1976 il dottor Takao notò, in una serie di pazienti, la presenza di cardiopatia congenita e facies caratteristica molto simile a quella dei pazienti descritti da DiGeorge e due anni più tardi il dottor Robert Shprintzen descrisse una nuova sindrome che presentava anomalie del palato, cardiopatia congenita e dismorfismi facciali e che chiamò Sindrome Velo-Cardio-Facciale (VCFS). Sebbene solo nei pazienti del medico italiano fossero presenti alterazioni del timo e delle paratiroidi, sia i pazienti descritti da DiGeorge, che da Takao e Shprintzen, presentavano delle caratteristiche cliniche costanti ed altre variabilmente presenti. Fin dal primo momento si ipotizzò che si potesse trattare di malattie aventi basi patogenetiche comuni, ma questa evidenza venne confermata soltanto negli anni '90, quando, grazie allo sviluppo delle metodiche di ibridazione in situ, si riuscì a mostrare che una delezione in omozigosi del cromosoma 22, al locus 22q11.2, era presente in circa il 90% dei pazienti [50, 51].

Le sindromi da microdelezione [52, 53] sono dei disordini genetici causati dalla mancanza di piccoli segmenti cromosomici che comprendono 10-30 geni. Alcune sindromi possono essere causate da mutazioni di singoli geni (es: sindrome di Angelman, Alagille), altre invece coinvolgono più di un gene. Tra queste ultime, la delezione sul braccio lungo del cromosoma 22 è considerata la più comune sindrome da microdelezione. Gli individui affetti dalla sindrome DiGeorge presentano la delezione su una sola copia del cromosoma 22.

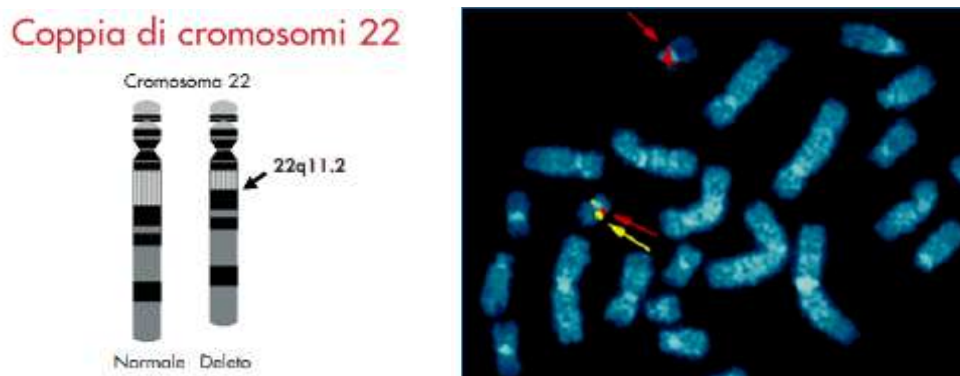


Figura 5. Delezione 22q11.2 (Modificata da Cutrupi et al. 2008 [53]).

A sinistra, la freccia indica la regione della delezione sul cromosoma 22; a destra, anomalie cromosomiche di un paziente con SDG visibili all'ibridazione in situ fluorescente.

Nella maggior parte dei casi, la mutazione avviene “de novo”, ma nel 10% dei casi è ereditata da un familiare, comportandosi in questo caso come un'autosomica dominante. Va però precisato che queste percentuali potrebbero essere falsate dalla estrema variabilità fenotipica (che può verificarsi anche all'interno della stessa famiglia) caratteristica di questa sindrome, che porta alcuni pazienti con sintomi clinici molto sfumati, a non avere mai una diagnosi o ad averla solo in età adulta, spesso proprio come conseguenza delle indagini genetiche fatte a causa di un parente di primo grado affetto e con manifestazioni più evidenti [53].

Nella regione interessata dalla delezione, sono localizzati quattro blocchi di sequenze genomiche ripetute, chiamate “low copy repeats” (LCR) [55]. Le LCR sono state trovate in tutti i cromosomi umani e sono implicate in un gran numero di riarrangiamenti cromosomici, come delezioni, duplicazioni e traslocazioni. Le LCR che si trovano in questa regione sono più complesse, più lunghe e con un più alto grado di omologia di ogni altra LCR associata a delezioni dell'intero genoma umano e proprio per questo potrebbero conferire una particolare instabilità alla regione cromosomica attraverso eventi di crossing-over non uguali e mediante ricombinazioni omologhe aberranti [55].

Nella maggior parte dei pazienti, la delezione comprende circa 30 geni, corrispondenti ad una regione di 3Mbp [57], mentre l'8% dei pazienti presenta una delezione più piccola, di 1.5 Mb, che comprende 24 geni (Figura 6) [58]. E' interessante sottolineare il fatto che l'estensione della delezione sembra non correlare con la gravità della sintomatologia [58, 59].

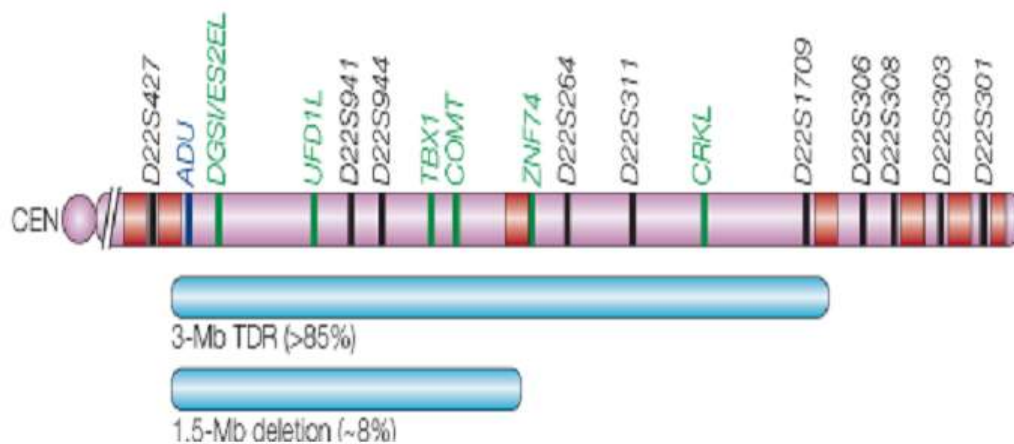


Figura 6. La delezione sul cromosoma umano 22.

In verde sono selezionati alcuni geni implicati ed in nero i markers molecolari usati per caratterizzare i pazienti con la delezione. Le regioni delete, rispettivamente di 3 Mb e 1.5 Mb, sono rappresentate in turchese. In rosso, le LCR.

Non è ancora stato chiarito con precisione quali siano i geni o il gene responsabile della patologia, tuttavia, quelli che sembrano essere maggiormente coinvolti sono:

- **tBX1:** questo gene è stato identificato nel 1997 da Chieffo et al., che hanno inoltre scoperto che esso può dare origine a due trascritti per splicing alternativo [60]. Il trascritto TBX1A comprende 1462 basi ed è composto di almeno 9 esoni mentre il trascritto TBX1B comprende 1539 basi ed è composto da almeno 10 esoni. tBX1 sembra avere un ruolo particolarmente importante nella patogenesi della malattia poiché codifica per un fattore di trascrizione che controlla l'attivazione di una serie di fattori di trascrizione e di crescita. Inoltre, considerando le strutture che derivano dai tessuti embrionali in cui TBX1 viene espresso, si può ipotizzare che esso abbia un ruolo importante nello sviluppo delle strutture facciali e ghiandolari all'interno della testa e della regione del collo, incluse le paratiroidi e il timo ed in quelle del cuore, con particolare riferimento alla regione del polo vascolare. A conferma di quanto detto, alcuni studi [53] hanno dimostrato che mutazioni nel gene tBX1 sono responsabili dei principali segni della sindrome 22q11.2 come:
 - anomalie facciali
 - difetti cardiaci
 - ipoplasia timica
 - insufficienza velofaringea
 - disfunzione parotidea
 - ipocalcemia.
- **HIRA (o tu-*PLE1*):** implicato nello sviluppo del tratto di efflusso del cuore [60].
- **uFD1L:** l'omologo nel topo è altamente espresso, durante l'embriogenesi, nella migrazione delle cellule delle creste neurali e, in particolare, in tessuti correlati ad alcuni segni clinici della sindrome [61].

Alcuni dei geni coinvolti nella delezione sono descritti nella Tabella 1.

Tabella 1. Geni compresi nella delezione 22q11

Gene (synonym)	Gene product	Product function
<i>DGCR6</i>	γ -laminin 1-like protein	Putative adhesion protein
<i>PRODH</i>	Proline dehydrogenase	Enzyme involved in proline catabolism
<i>DGCR2 (IDD/LAN)</i>	Integral membrane protein; C-type lectin	Putative adhesion receptor
<i>TSK (STK)</i>	Serine/threonine kinase	Signal transduction
<i>DGSI (ES2e)</i>	Nuclear protein	Essential for early embryonic development
<i>GSCL</i>	Goosecoid-like protein	Putative transcription factor
<i>SLC25A1 (CTP)</i>	Citrate transporter protein	Catalyses citrate transport across the inner mitochondrial membrane
<i>CLTCL1* (CLTD)</i>	Clathrin heavy chain-like protein	Vesicle-mediated intracellular transport
<i>HIRA (DGCR1)</i>	Protein with WD40 domains	Putative transcriptional regulator
<i>NLVCF</i>	Nuclear protein	Unknown
<i>UFD1L</i>	Ubiquitin degradation 1-like protein	Putative role in ubiquitin-dependent protein degradation
<i>CDC45L</i>	Cell-cycle initiator protein	Putative role in initiation of DNA replication
<i>CLDN5 (TMVCF)</i>	Claudin 5	Component of tight junctions
<i>PNUTL1 (CDCREL1)</i>	Septin-like protein	Putative role in cytokinesis
<i>GP1BB</i>	Platelet glycoprotein β -subunit	Component of transmembrane protein
<i>TBX1</i>	T-box 1	Putative transcription factor
<i>GNB1L (WDR14)</i>	G protein β -subunit	Component of signal-transducing G proteins
<i>TR (TRXR2)</i>	Thioredoxin reductase	Regulation of the redox protein thioredoxin
<i>COMT</i>	Catechol-O-methyltransferase	Catecholamine metabolism
<i>ARVCF</i>	Catenin-like protein	Putative role in adherens junctions
<i>T10</i>	Serine/threonine-rich protein	Unknown
<i>RANBP1</i>	RAN-binding protein 1	Intracellular transport
<i>ZNF74</i>	Protein with 12 zinc-finger domains	Putative transcription regulator
<i>CRKL</i>	Adaptor protein with SH2/SH3/SH3 domains	Protein binding
<i>LZTR1 (TCFL2)</i>	Putative DNA-binding protein	Putative transcription factor

1.3.2 Il quadro clinico

Il quadro clinico della Sindrome DiGeorge è molto eterogeneo. Tra le manifestazioni più frequenti ci sono le anomalie cardiache, presenti nel 75% dei pazienti [62, 63]. Nella maggior parte dei casi, sono, insieme all'ipocalcemia, il sintomo di esordio. Sebbene la prognosi dei pazienti con cardiopatia abbia visto un notevole miglioramento nell'ultimo ventennio, l'evoluzione della cardiopatia congenita rappresenta ancora la prima causa di morte di questi pazienti. L'ipocalcemia è dovuta all'alterato sviluppo delle paratiroidi, ghiandole implicate nella regolazione dei livelli di calcio nel sangue. L'ipocalcemia può essere responsabile di convulsioni, tremori o tetania neonatale. Tale alterazione tende a normalizzarsi nel tempo grazie a meccanismi di compenso messi in atto dal tessuto paratiroideo residuo. In alcuni casi l'ipoparatiroidismo può essere latente, con manifestazione tardiva dei sintomi in condizioni di stress, dopo interventi chirurgici o infezioni gravi. I bambini con Sindrome DiGeorge presentano inoltre, nella quasi totalità dei casi, alcune caratteristiche del volto peculiari (facies): bocca piccola, tendenzialmente aperta e con il labbro superiore estroverso, rime palpebrali strette, padiglioni auricolari piccoli, naso prominente, ipertelorismo, micrognazia, palato ogivale e pienezza periorbitale. Tali caratteristiche possono attenuarsi con l'età. Possono inoltre presentarsi anomalie otorinolaringoiatriche, disturbi dell'alimentazione, anomalie gastrointestinali e anomalie neuropsichiatriche. Circa il 40% dei pazienti presenta infezioni ricorrenti [64].

1.3.2.1 *Alterazioni immunologiche e patologie autoimmuni*

Circa il 75% dei pazienti con Sindrome DiGeorge presenta un coinvolgimento del sistema immunitario, secondario all'ipoplasia o aplasia del timo [64]. Diversi studi hanno evidenziato in alcuni pazienti una diminuita funzione del sistema immunitario rispetto ai soggetti della stessa età. Il quadro delle anomalie immunologiche è molto ampio: varia da una completa assenza del timo e dei linfociti, che necessita di un trapianto di timo o di midollo osseo a un normale profilo immunologico [65].

In base a questa variabilità, i pazienti vengono classificati come:

- “SDG completi” (0,5-1,5% dei casi), quando presentano un’immunodeficienza grave combinata, caratterizzata da linfopenia marcata, riduzione o totale assenza dei linfociti T, secondaria all’aplasia timica [66, 67].
- “SDG parziali”, quando presentano un difetto immunologico lieve/moderato, che riguarda soprattutto le cellule T [66, 68].

L’immunodeficienza nei pazienti “DGS parziali” sembra non essere causata dall’assenza di timo ma essere dovuta alla anormale migrazione verso la loro corretta posizione delle strutture timiche durante l’embrionogenesi [69]. Infatti uno studio retrospettivo su bambini affetti da SDG ha mostrato una dislocazione aberrante del tessuto timico, generalmente nel retro faringe [70]. È quindi altamente probabile che il timo nei pazienti con SDG parziale non sia mancante, ma anormalmente collocato.

Generalmente si assiste ad una moderata diminuzione del numero dei linfociti T CD3⁺ nel sangue periferico. Tra questi, i linfociti CD3⁺CD4⁺ sembrano risentire del deficit in maniera più marcata rispetto ai CD3⁺CD8⁺, di contro c’è aumento dei CD19⁺, natural killer (CD16⁺CD56⁺) [53]. La compromissione del sistema immunitario sembra essere età-dipendente, con un deficit maggiore nel periodo neonatale [71]. Normalmente, dopo 1-2 anni di vita, si verifica un decremento del numero di linfociti nel sangue a causa della fisiologica involuzione del timo; questo accade anche ai bambini affetti da SDG, ma in questo caso il decremento è minore e porta ad una relativa attenuazione del deficit linfocitario. Questa compensazione avviene probabilmente attraverso la produzione di linfociti periferici [72- 74]. L’espansione post-timica porta ad un pool di cellule T più scarsamente differenziate rispetto a quelle che derivano dai recenti emigranti timici (RTE). Questi pazienti quindi hanno un numero di linfociti T relativamente normale, ma questo fattore potrebbe non riflettere accuratamente la competenza immunitaria.

Nella maggioranza dei pazienti inoltre, la risposta proliferativa sembra essere nella norma, sebbene alcuni pazienti mostrino basse risposte nei confronti dei mitogeni.

E’ stato descritto un ampio spettro di deficienze anticorpali e molti studi hanno riportato risultati contrastanti. Il numero totale delle cellule B sembra essere nella

norma, sebbene siano state riscontrate delle anomalie nella sottopopolazione delle cellule B di memoria (CD27⁺). Non è chiaro se questo sia dovuto ad un effetto diretto della delezione o ad un'alterata interazione fra i linfociti T e B [72, 75].

La maggior parte dei pazienti affetti da SDG sviluppa patologie autoimmuni, quali citopenie, autoimmunità sistemica (in particolare l'artrite reumatoide) e autoimmunità organo specifica (in particolare la tiroidite autoimmune). Il meccanismo con cui si verifica l'autoimmunità è poco chiaro, ed è probabilmente di natura multifattoriale. La causa principale dell'insorgenza di fenomeni autoimmuni sembra essere la disregolazione del sistema immunitario.

Evidenze sperimentali suggeriscono inoltre che il timo gioca un ruolo essenziale nel mantenimento dell'auto-tolleranza, grazie alla generazione di una popolazione di cellule T immunomodulanti: le Treg. L'anomalia timica potrebbe pertanto determinare una ridotta produzione di cellule Treg CD4⁺CD25⁺, con conseguente insorgenza di fenomeni autoimmuni. Anche la linfopenia evidenziata in pazienti affetti da SDG potrebbe svolgere un ruolo nell'insorgenza dell'autoimmunità. Studi meccanicistici, modelli animali e l'esperienza clinica hanno dimostrato che le alterazioni nell'omeostasi delle cellule T indotte da linfopenia sono infatti compatibili con la rottura dell'auto-tolleranza. Mentre il numero assoluto di Treg CD4⁺CD25⁺ è ridotto nei topi linfopenici, queste cellule sono più efficienti in fase di espansione post timica, portando ad un relativo incremento della percentuale di queste cellule regolatorie. Questo suggerisce che la sola linfopenia non può essere la causa della deplezione delle cellule Treg, responsabile dell'insorgenza dell'autoimmunità. Tuttavia l'espansione post timica porta alla generazione di cellule T con un diminuito repertorio di diversità recettoriale che, a sua volta, potrebbe predisporre verso lo sviluppo di autoimmunità.

Anche le infezioni possono portare alla malattia autoimmune e possono farlo mediante una varietà di meccanismi, compreso il rilascio degli antigeni sequestrati attraverso il danno tissutale e il "mimetismo molecolare", ovvero la somiglianza strutturale tra peptidi microbici ed endogeni. I pazienti con immunodeficienze sono meno capaci di contrastare gli agenti infettivi e questo si traduce in risposte immunitarie croniche e danni tissutali, una situazione che favorisce l'inattivazione della tolleranza

periferica. Tuttavia, lo sviluppo di autoimmunità non sembra essere correlato al numero di infezioni in pazienti con SDG.

1.3.3 Diagnosi e terapia

Si può arrivare a sospettare la sindrome DiGeorge grazie al quadro clinico descritto in precedenza (la cardiopatia congenita è il sintomo più frequente, presente nel 75-80% dei pazienti). Il sospetto clinico deve poi essere confermato da indagini molecolari/genetiche, mediante la FISH (Fluorescent in situ hybridization) su un campione di sangue che permette di dimostrare la microdelezione nella regione 22q11.2. Il 5-10% dei pazienti non presenta apparenti delezioni genomiche, ma studi più approfonditi hanno dimostrato, in alcuni soggetti, delle microdelezioni atipiche del braccio lungo del cromosoma 22, non evidenziabili con FISH standard. In caso di FISH22 positiva nel bambino, è consigliabile eseguire lo stesso esame nei genitori, per verificare l'eventuale familiarità della patologia.

L'eterogeneità delle manifestazioni cliniche non permette di effettuare strategie di follow-up valide per tutti i pazienti. L'approccio terapeutico deve pertanto essere frutto di una stretta collaborazione tra specialisti e variare in base alle diverse manifestazioni cliniche.

1.4 LA VITAMINA D

1.4.1 Definizione e struttura chimica

Un composto chimico organico viene scientificamente nominato "vitamina" quando non può essere sintetizzato in quantità sufficiente da un organismo e deve quindi essere introdotto con gli alimenti. Anche se la vitamina D viene ancor oggi comunemente chiamata "vitamina", essa non può essere considerata propriamente una vitamina, cioè un nutriente essenziale, in quanto può essere sintetizzata in quantità adeguate da tutti i

mammiferi a livello cutaneo sotto l'azione della luce solare. Più corretto sarebbe infatti parlare di “sistema endocrino della Vitamina D” poiché, analogamente ad un ormone, viene sintetizzata nella pelle ed utilizzata in diversi distretti dell'organismo.

Dal punto di vista chimico, questo sistema è costituito da un gruppo di secosteroidi, ovvero steroidi la cui struttura ciclopentanoperidrofenantrenica è aperta a livello del legame situato in posizione 9-10 dell'anello B.

Le forme principali che costituiscono il gruppo vitaminico D sono:

vitamina D1: composto costituito in parti 1:1 di ergocalciferolo e lumisterolo

vitamina D2: ergocalciferolo

vitamina D3: colecalciferolo

vitamina D4: diidroergocalciferolo

vitamina D5: sitocalciferolo

Le due più importanti forme sono la vitamina D2 e la vitamina D3, ed il termine generico “vitamina D” viene utilizzato indifferentemente per entrambe.

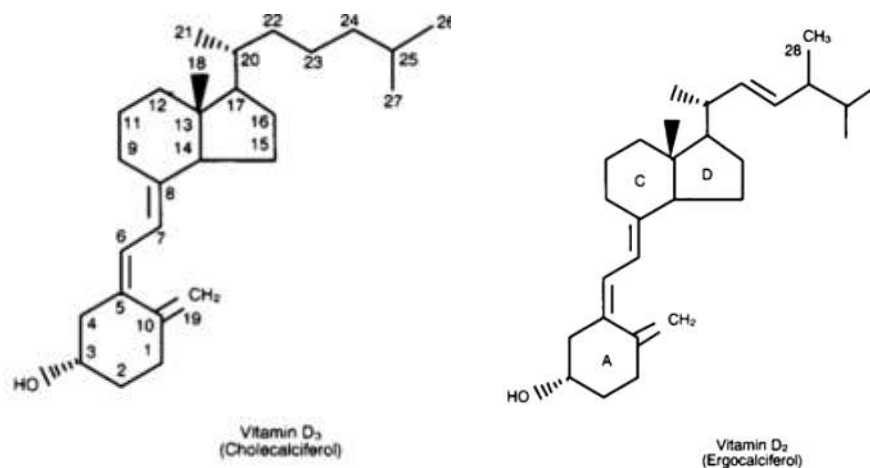


Figura 7: Struttura della vitamina D (da Le Grusse y Watier, 1993; Rapado, 2000). Entrambe le vitamine hanno identica attività biologica e differiscono solo nella catena laterale al carbonio 17 che è satura per la D3 e insatura (C22 e C23) e metilata (C24) per la D2.

1.4.2 Biosintesi

Come detto precedentemente, la vitamina D esiste principalmente in due forme: colecalciferolo ed ergosterolo. Il colecalciferolo può essere sintetizzato negli strati basali dell'epidermide partendo dal colesterolo, sotto l'influenza dei raggi ultravioletti. L'ergocalciferolo è presente nei vegetali e viene sintetizzata a partire dall'ergosterolo, seguendo le stesse tappe fotochimiche del colecalciferolo.

L'assorbimento da parte del 7-deidrocolesterolo (7-DHC) di radiazioni UV (290–315 nm) causa il clivaggio del legame tra il C9 e il C10 ed una isomerizzazione del 5,7-diene alla forma s-cis, con relativa formazione della s-cis,s-cis-previtaminaD₃.

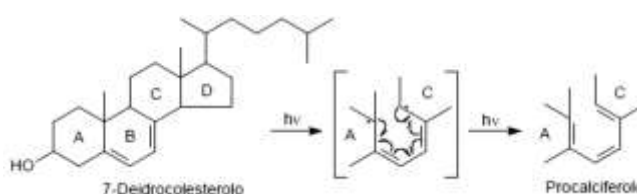


Figura 8. Formazione del Procalciferolo a partire dal 7-Deidrocolesterolo

Poiché è presente un'interazione sterica tra l'anello C e il gruppo metilico sul carbonio 19 della s-cis,s-cis-previtaminaD₃, questo conformero è energeticamente sfavorito e quindi meno stabile. Di conseguenza, nei solventi organici (come ad esempio l'esano), si avrebbe una rotazione del legame singolo tra il C5 e il C6 che porterebbe alla formazione di una più energeticamente stabile s-trans,s-cis previtaminaD₃; sebbene termodinamicamente più favorito, questo conformero non potrebbe però essere trasformato in colecalciferolo. Affinché si abbia la produzione della vitamina D₃, è necessario quindi che la pre-vitamina D₃ venga mantenuta nella forma termodinamicamente sfavorita s-cis, s-cis. Ciò è reso possibile dall'interazione del 7-DHC con gli acidi grassi della membrana. Conseguentemente, si verifica un riarrangiamento intramolecolare dell'idrogeno per formare la vitamina D₃. La velocità

di reazione di questa isomerizzazione è direttamente proporzionale alla temperatura (Figura 9) [76- 78].

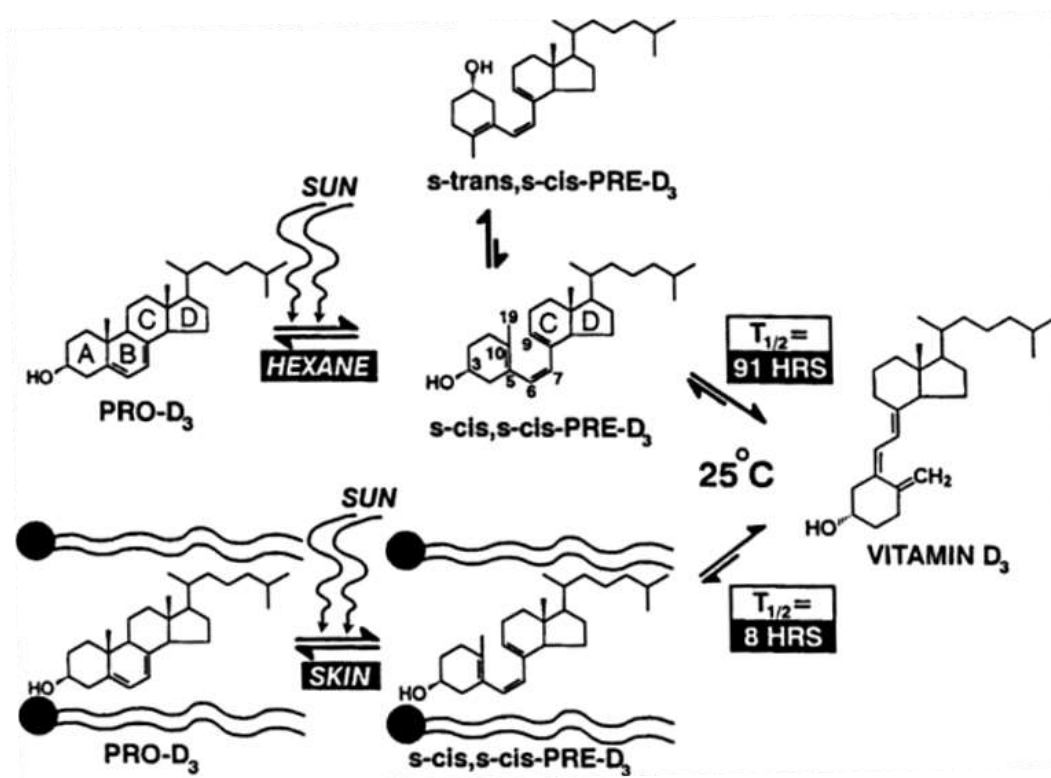


Figura 9. Formazione della vitamina D₃ in solventi organici e nella pelle (da Tai et al. 2010 [78]).

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che questo processo non è catalizzato né è stato rilevato alcun intermedio. Ciò ha portato alla conclusione che si tratti di un riarrangiamento σ tropico [79]. Questo tipo di reazione coinvolge il movimento di un legame σ con riarrangiamento simultaneo dei legami π . In questo caso il processo concertato intramolecolare comporta la trasposizione [1,7] dell'idrogeno. Lo shift può avvenire in maniera antara o supra facciale a seconda che l'idrogeno si muova da una faccia all'altra o sulla stessa faccia, rispettivamente. Nel caso dello shift [1,7] dell'idrogeno è permessa solo la trasposizione antarafacciale (conformazione s-cis) [80].

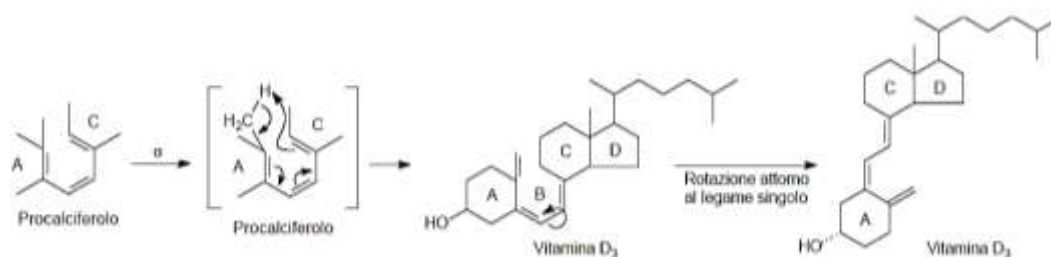


Figura 10. Formazione della Vitamina D a partire dal Procalciferolo

L'isomerizzazione della previtamina D_3 a vitamina D_3 è l'ultimo step della sintesi del colecalciferolo nella pelle. In seguito alla formazione del colecalciferolo, si scindono le interazioni idrofile e idrofobe della *s-cis,cis-s*-previtamina D_3 con gli acidi grassi della membrana, facilitando così l'espulsione della vitamina D_3 dalla membrana cellulare nello spazio extracellulare. Una volta formata, la vitamina D_3 viene immessa nel torrente circolatorio attraverso la diffusione dall'epidermide al letto capillare del derma. Poco si sa circa il meccanismo di questo processo di traslocazione. L'eccessiva esposizione ai raggi solari non comporta intossicazione da vitamina D , perché sia la previtamina D_3 che la vitamina D_3 possono essere trasformate in prodotti inattivi [78].

1.4.3 Metabolismo

Dopo essere stato immesso nel torrente circolatorio, il colecalciferolo si lega ad una proteina specifica di trasporto (alfa-globulina), chiamata Vitamin D Binding Protein (DBP) o all'albumina. Il colecalciferolo costituisce un pro-ormone e rappresenta il precursore di molti metaboliti fisiologicamente attivi, il più importante dei quali sembra essere l'1,25-diidrossicolecalciferolo ($1,25(OH)_2D_3$ o calcitriolo) che viene prodotto attraverso una serie di passaggi enzimatici proprio a partire dal colecalciferolo (Figura 11) [81].

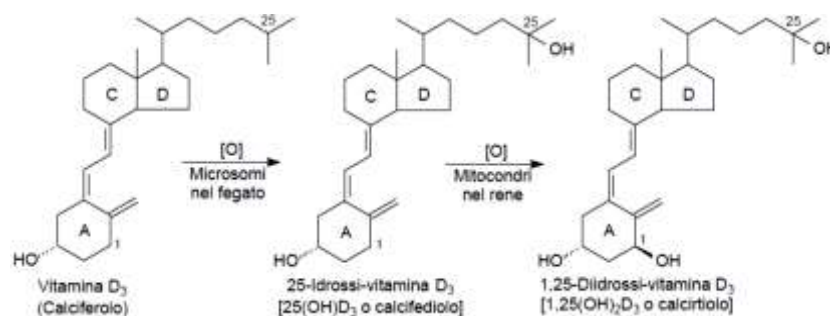


Figura 11. Idrossilazione della Vitamina D a 25(OH)D₃ e 1,25(OH)₂D₃

L'ergocalciferolo segue le stesse tappe metaboliche portando alla produzione dei medesimi prodotti. La prima tappa del processo di attivazione metabolico della vitamina D avviene nel fegato e consiste nell'idrossilazione del carbonio 25 del colecalciferolo ad opera del complesso del citocromo P450 (CYP2R1), con relativa formazione della 25 idrossivitamina D o calcidiolo (25(OH)D₃) (Figura 11) [81]. Strutturalmente, il CYP2R1 adotta una conformazione chiusa con il canale di accesso al substrato ricoperto da una β -elica, che lascia esposta una stretta zona per il contatto con lo specifico ligando. Il sito attivo è rivestito da una sequenza conservata di residui prevalentemente idrofobici. La vitamina D₃ è ripiegata in una conformazione allungata con la catena laterale alifatica rivolta verso il gruppo eme del citocromo. Una mutazione del gene codificante per il CYP2R1 è stata riconosciuta essere causa di una forma genetica di rachitismo da carenza di vitamina D. La 25(OH)D₃ è il principale metabolita circolante della vitamina D, ha un'emivita di circa 12-18 giorni e le sue concentrazioni sieriche rappresentano l'indice biochimico più attendibile dello stato vitaminico [82].

Anche la 25(OH)D₃ si lega con elevata affinità alla DBP, i cui livelli plasmatici, 20 volte superiori, condizionano la farmacocinetica del metabolita, in quanto il composto legato ha un accesso limitato alle cellule bersaglio ed è meno suscettibile al metabolismo epatico con conseguente aumento della sua emivita in circolo [83]. DBP pertanto agisce, oltre che come trasportatore, anche come modulatore del metabolismo della vitamina D in relazione alla sua concentrazione ematica, ottimizzandone il catabolismo cellulare e/o regolandone l'attività biologica, correlata con la

concentrazione di ormone libero, proteggendo così i tessuti da livelli tossici di vitamina [84].

La trasformazione della $25(\text{OH})\text{D}_3$ in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ avviene principalmente nel rene, dove il calcidiolo viene prima filtrato dal glomerulo e successivamente riassorbito attivamente all'interno delle cellule dell'orletto a spazzola del tubulo prossimale renale, che contengono l'enzima 1α -idrossilasi CYP27B1, attraverso un processo di endocitosi megalina-mediato [85- 87]. La megalina fa parte di un gruppo di proteine complesse, localizzate sulla superficie delle cellule del tubulo renale prossimale, in grado di riassorbire il complesso $25(\text{OH})\text{D}_3$ -DBP filtrato dal rene. I livelli di megalina sono aumentati da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e ciò costituisce un meccanismo di controllo positivo nella produzione dell'ormone attivo [88]. La DBP viene degradata nei lisosomi mentre la $25(\text{OH})\text{D}_3$, in base alla concentrazione dell'ormone attivo, può essere veicolata nei mitocondri dove è presente l'enzima CYP27B1 che provvede ad idrossilarla in posizione $1-\alpha$, oppure ritorna in circolo dove si lega di nuovo ad una DBP [89- 91].

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ viene considerata un ormone poiché svolge azioni endocrine sistemiche e come per tutti gli ormoni la sua produzione ed il suo catabolismo sono finemente regolati da un meccanismo a feedback basato su livelli plasmatici di paratormone (PTH), calcio e fosforo (Figura 12).

Il calcio introdotto con la dieta regola l'enzima 1α -idrossilasi direttamente, attraverso variazioni del calcio sierico o per azione sulle cellule dei tubuli prossimali e indirettamente, alterando i livelli di PTH: l'ipocalcemia infatti aumenta i livelli dell'ormone circolante che è in grado di stimolare l' 1α -idrossilasi [90]. Anche la restrizione dietetica del fosfato accresce l'attività dell'enzima renale, indipendentemente dalla concentrazione del calcio e PTH; questo probabilmente avviene attraverso l'azione delle fosfatone, fosfoglicoproteine della matrice extracellulare, che sono in grado di agire come mediatori della regolazione del fosfato sull'attività dell'enzima e/o sul gene che lo controlla [90, 92]. Sono considerati regolatori positivi dell'enzima 1α -idrossilasi anche calcitonina, l'ormone somatotropo e la somatomedina. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ limita, con meccanismo di feed-back negativo, i suoi stessi livelli circolanti attraverso l'inibizione dell'induzione PTH mediata dell'attività del gene promotore [93].

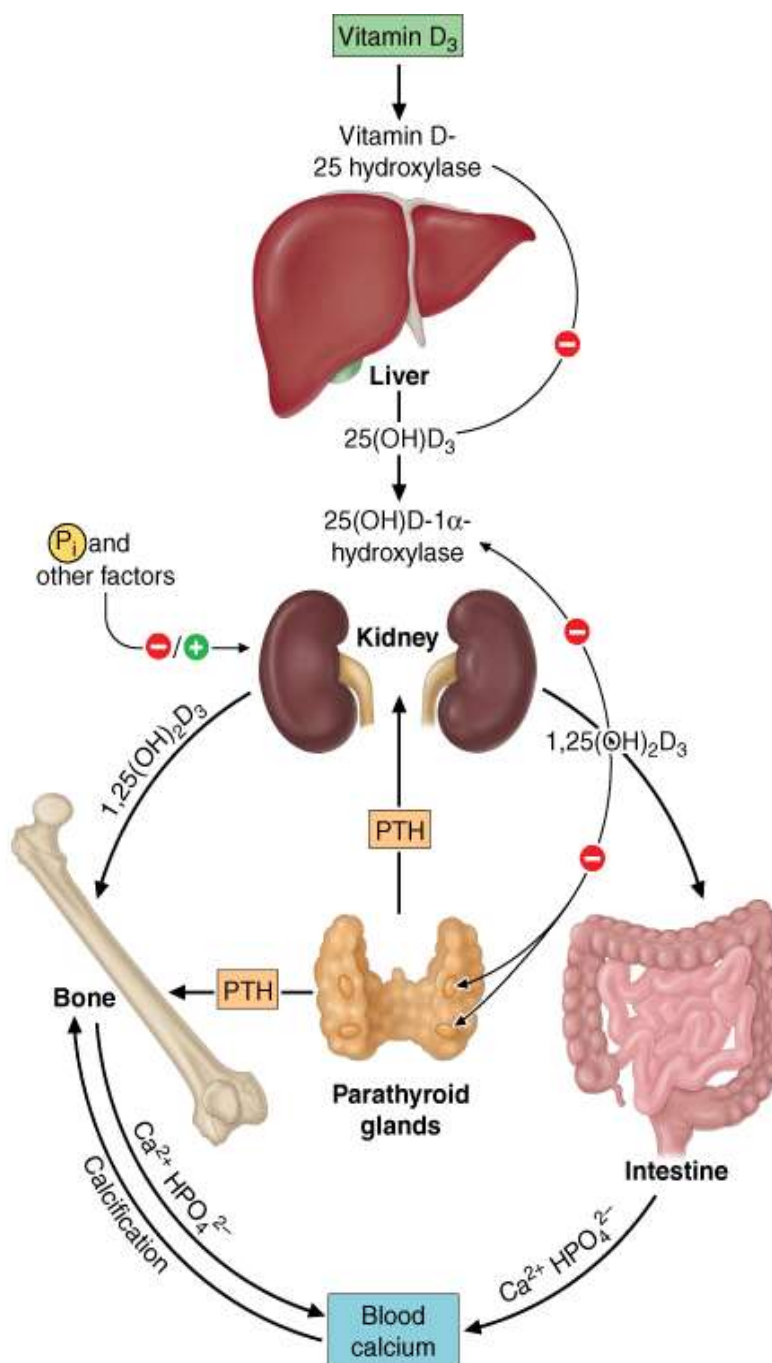


Figura 12. Rappresentazione schematica del circuito di regolazione ormonale del metabolismo della vitamina D (da Fauci et al. 2008 [93]).

Una riduzione del calcio sierico richiede un proporzionale aumento della secrezione PTH che mobilizza il calcio dalle ossa. Il PTH promuove la sintesi renale di 1,25(OH)₂D che a sua volta stimola il riassorbimento di calcio dalle ossa e dall'intestino e regola attraverso un feedback negativo la sintesi di PTH.

Altri fattori che controllano i livelli sierici della 1,25(OH)₂D₃ e dei suoi precursori sono mostrati in Tabella 2.

Tabella 2. Fattori capaci di indurre una variazione della concentrazione plasmatica della vitamina D

	FATTORI	EFFETTO SULLA CONCENTRAZIONE PLASMATICA	
VITAMINA D ₃	Aumento dell'età	↓	
	Aumento della pigmentazione	↓	
	Obesità	↓	
	Acido para-amminobenzoico	↓	
25(OH)D ₃	Somministrazione di ormone nativo	↓	
	Anticonvulsivanti	↓	
	Glucocorticoidi	↓	
	Aumento dell'età	↓	
	Aumento della pigmentazione	↓	
	Insufficienza renale	↓	
	Dieta povera di calcio	↓	
	Dieta povera di fosforo	↓	
	Obesità	↓	
	Gravidanza	↓	
	Stronzio	↑	
	Mesi Invernali	↓	
	1,25(OH) ₂ D ₃	Derivati 4-amminochinolinici	↓
		Calcitonina	↑
Estrogeni		↑	
Glucocorticoidi		↓	
Aumento dell'età		↓	
Ketoconazolo		↓	
Dieta povera di calcio		↑	
Dieta povera di fosforo		↑	
Obesità		↑	
Gravidanza		↑	
PTH		↑	
Insufficienza renale		↓	
Stronzio		↓	
Verapamile		↓	

Altri tipi di cellule possiedono il corredo enzimatico necessario alla produzione dell'ormone attivo *in loco*. L'enzima 1α -idrossilasi è presente in almeno 10 diversi tessuti oltre che nel tubulo prossimale del rene (Tabella 3), ma la sua regolazione nei siti extrarenali è molto diversa e non ancora del tutto nota. In particolare, nelle cellule dendritiche l'espressione dell'enzima 1α -idrossilasi sembra essere associata con la maturazione p38 MAPK e NFkB-dipendente delle stesse cellule [95]. Dati recenti dimostrano che anche le cellule T esprimono gli enzimi responsabili della produzione di calcitriolo [96].

Tabella 3. Siti di produzione extrarenale di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nell'uomo

TESSUTO
Cellule Dendritiche
Colon
Cellule endoteliali
Cervello
Mammella
Insule pancreatiche
Paratiroidi
Placenta
Prostata
Cute

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ extrarenale sembra agire in primo luogo come fattore autocrino/paracrino con specifiche funzioni cellulari, come l'inibizione della proliferazione, la promozione della differenziazione, la regolazione della risposta immune [97, 98].

1.4.4 Meccanismo di azione

Gli effetti biologici della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sono mediati dal legame con una proteina recettoriale solubile chiamata “Recettore della Vitamina D” (VDR), che lega la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con alta affinità ed alta selettività. Il VDR, che appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari, è composto da una singola catena polipeptidica di 427 aminoacidi strutturata in tre domini:

- La porzione ammino terminale è piuttosto corta e contiene un dominio di transattivazione definito AF-1.
- La parte centrale contiene il dominio legante il DNA (DBD) caratterizzato dalla presenza di due motivi a dita di zinco che sono responsabili delle interazioni ad alta affinità tra la proteina e il DNA.
- Il dominio carbossi-terminale contiene il dominio di legame del ligando (LBD) che lega l'ormone a livello del suo anello A, contenente il gruppo 1α -idrossilato [85].

Nella cellula bersaglio, l'interazione della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con il VDR scatena una complessa cascata di eventi molecolari che si conclude con la modulazione dell'espressione genica. Al centro di questo meccanismo c'è l'interazione del VDR con il recettore dei retinoidi (RXR) per formare un complesso eterodimerico. Questo complesso si lega a specifiche sequenze del DNA chiamate Vitamin D-response elements (VDRE), situate su specifiche regioni promoter dei geni target, determinando modifiche conformazionali del DNA genomico e consentendo in tal modo alla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ di influenzare i processi di trascrizione del gene e la conseguente sintesi proteica [99, 100]. Come illustrato in Figura 13, la sintesi proteica può essere sia stimolata che inibita dalla vitamina D, in funzione della capacità dell'eterodimero di reclutare come partner trascrizionali molecole di co-attivatori e/o co-repressori [101, 102].

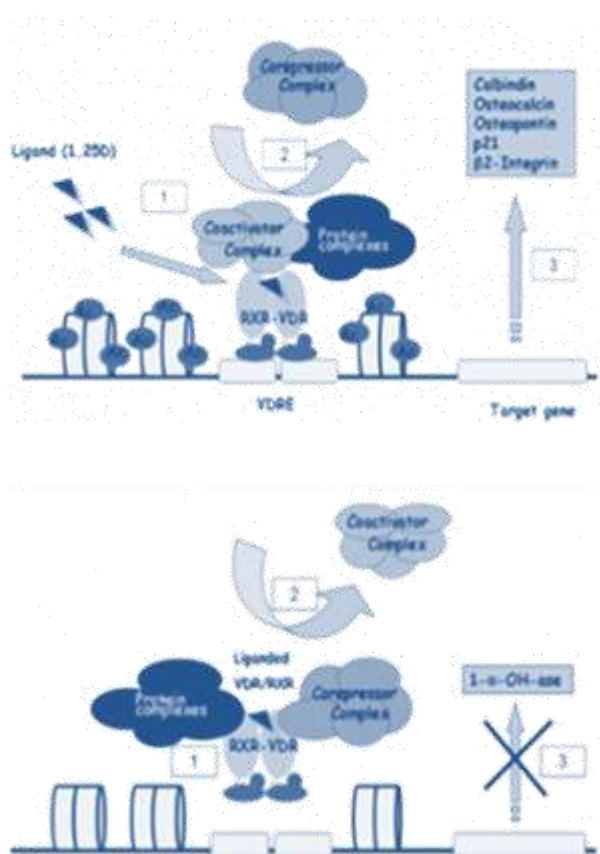


Figura 13. Meccanismo d'azione del VDR (da Pasquali et al. 2009 [103])

Nella figura in alto è schematizzato il processo di attivazione della sintesi proteica da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: 1) arrivo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ che per affinità si lega al complesso recettoriale composto dall'eterodimero VDR-RXR; 2) allontanamento del complesso proteico inibitore e sua sostituzione con il complesso proteico attivatore ed altre proteine di supporto che facilitano l'acetilazione degli istoni e l'attivazione del VDRE; 3) attivazione del processo di sintesi proteica con produzione di proteine diverse a seconda della cellula bersaglio.

Nella figura in basso è schematizzata l'inibizione della sintesi proteica da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: 1) arrivo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ che per affinità si lega all'eterodimero VDR-RXR già coinvolto nell'attivazione del VDRE; 2) allontanamento del complesso proteico attivatore e delle altre proteine attivatrici e sostituzione con complesso proteico inibitore. Ne risulta una inibizione della acetilazione degli istoni con riduzione dell'apporto energetico; 3) la trascrizione proteica in corso viene inibita.

Recentemente, nel tentativo di giustificare l'esistenza di risposte rapide indotte dalla vitamina D e difficilmente spiegabili dal lento meccanismo genetico trascrizionale, è stata anche postulata l'esistenza di un recettore della vitamina D alternativo, posizionato sulla membrana cellulare. Tale recettore, che potrebbe anche essere costituito dallo stesso VDR migrato sulla membrana cellulare dal nucleo, dopo interazione con l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, agirebbe inducendo la formazione di una serie di secondi messaggeri o fosforilando alcune proteine cellulari.

1.4.5 Definizione dei livelli sierici di vitamina D

Nonostante la forma biologicamente attiva della vitamina D sia la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, essa non può essere considerata un indice attendibile dello status vitaminico a causa della sua breve emivita (circa 4 ore). Al contrario la $25(\text{OH})\text{D}_3$, con un'emivita di circa 2 settimane, risulta essere un indice affidabile ed il suo valore viene utilizzato per monitorare i livelli di vitamina D nell'organismo. Sebbene non ci sia un accordo univoco sui livelli ottimali, recentemente sono stati definiti i parametri per valutare lo status vitaminico D, con la determinazione dei seguenti livelli [103]:

- carenza: < 20 ng/ml (<50 nmol/L)
- insufficienza: 20-30 ng/ml (51-74 nmol/L)
- sufficienza: > 30 ng/ml (>75 nmol/L)

1.4.6 Fisiologia della vitamina D

Le azioni della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si distinguono in classiche e non classiche.

Riguardo le prime, il sistema endocrino D regola, in concerto con il paratormone(PTH), il metabolismo del calcio, funzione indispensabile per sviluppo, formazione, accrescimento e stabilità dello scheletro e delle ossa.

Tra le azioni non classiche, la scoperta della localizzazione del VDR su organi bersaglio diversi da quelli classici, ha evidenziato ruoli inattesi per la Vitamina D. In particolar

modo, la scoperta del VDR nelle cellule del sistema immune ed il fatto che numerose di queste cellule possiedano il corredo enzimatico per produrre l'ormone, hanno indicato che esso svolge importanti proprietà immunoregolatrici [85, 96].

1.4.6.1 *Effetti classici*

Il Calcitriolo svolge un ruolo essenziale nella regolazione del metabolismo fosfo-calcico. Globalmente ha un effetto ipercalcemizzante e la finalità delle sue diverse azioni è quella di mantenere una concentrazione fosfo-calcica sierica disponibile per la mineralizzazione dell'osso. La diminuita disponibilità di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ causa un ridotto apporto di calcio nell'organismo e una conseguente sottrazione del calcio dalle ossa. Ciò comporta malformazioni dello scheletro e rammollimento delle ossa che sfociano nel rachitismo, se il disturbo colpisce individui nell'età di sviluppo. Lo sforzo dell'organismo per mantenere nella norma i livelli del calcio provoca un eccesso di produzione di paratormone con conseguente iperparatiroidismo secondario. Il calcitriolo agisce sia a livello dell'intestino che dell'osso e del rene. A livello intestinale stimola l'aumento dell'assorbimento di calcio e fosforo. È noto infatti che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ attiva, mediante interazione con il VDR, la sintesi di specifiche proteine deputate al trasporto transcellulare del calcio. In particolare la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agisce stimolando la sintesi proteica di proteine che costituiscono canali di trasporto ad alta selettività per il calcio (TRPV5 e TRPV6) e proteine di trasferimento e/o di estrusione del calcio dalle cellule (calbindina, NCX1, PMCA1b) [105].

Nell'osso la vitamina D stimola a livello dell'osteoblasta la produzione della proteina RANKL che, legandosi al suo recettore, il RANK, espresso sulla membrana dei preosteoclasti, stimola l'aggregazione e la trasformazione di questi in osteoclasta maturo. In tal modo la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ attiva il riassorbimento osseo, ma, contemporaneamente, con un fine meccanismo, attua un'autoregolazione del fenomeno. Infatti, sempre a livello osteoblastico, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimola anche la sintesi di osteoprotegerina, una proteina capace di legarsi al RANKL e prevenirne il legame con il RANK [106].

Nel rene, la sua azione si compie a livello dei tubuli distali renali, dove aumenta il riassorbimento di calcio e fosfato.

Il calcitriolo agisce di concerto con il paratormone. Questo ormone viene secreto dalle paratiroidi ed ha anch'esso effetto ipercalcemizzante. In caso di ipocalcemia è stimolata la secrezione di PTH. Questo comporta un aumento dell' escrezione urinaria di fosfato e la stimolazione dell'enzima 1α idrossilasi renale che catalizza la sintesi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

1.4.6.2 Effetti non classici: regolazione della risposta immune

Il sistema endocrino della vitamina D è coinvolto in una varietà di processi biologici in grado di modulare le risposte immunitarie e svolge un ruolo importante nelle malattie autoimmuni. Molteplici evidenze indicano che l'insufficienza di vitamina D, definita da un livello sierico di $25(\text{OH})\text{D}_3$ inferiore a 20 ng/ml, correla con un'aumentata incidenza di malattie autoimmuni ed una maggiore incidenza di vari tipi di tumori [103]. Il sistema endocrino della vitamina D modula le risposte immunitarie di tipo adattativo attraverso molteplici meccanismi, che coinvolgono soprattutto cellule dendritiche e cellule T (Figura 14).

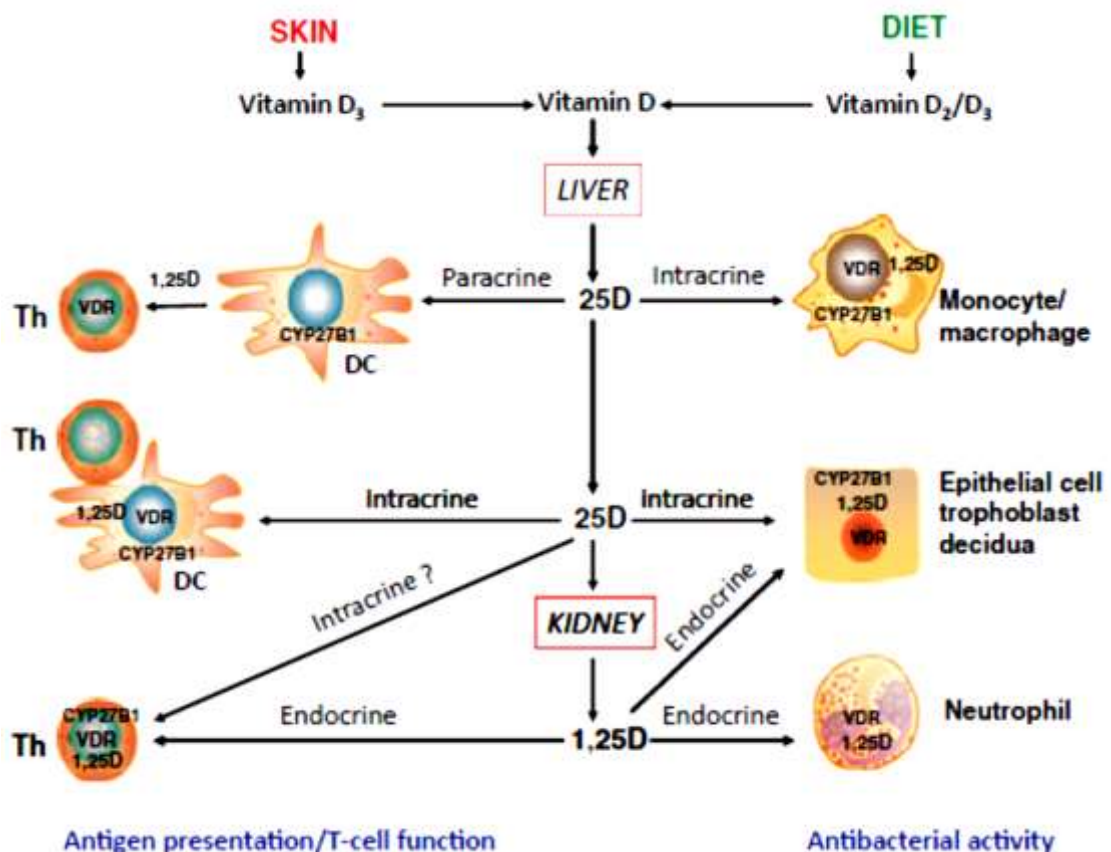


Figura 14. Meccanismi della risposta immune innata ed adattativa alla vitamina D (da Hewison 2012[106]).

Cellule bersaglio della vitamina D, come monociti/macrofagi e DC, che esprimono CYP27B1 e VDR, possono utilizzare la $25(\text{OH})\text{D}_3$ per risposte intracrine, convertendola nella forma $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Nei monociti/macrofagi la sintesi intracrina di $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promuove la risposta antibatterica contro le infezioni. Nelle DC la sintesi intracrina di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibisce la maturazione, modulando così la funzione delle Th. La risposta delle Th alla $25(\text{OH})\text{D}_3$ può anche essere mediata in modo paracrina, attraverso l'azione della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ generata dalle DC sul VDR espresso dalle cellule Th. Gli effetti intracrini della $25(\text{OH})\text{D}_3$ possono anche verificarsi nelle cellule epiteliali che esprimono il CYP27B1/VDR. Comunque altre cellule, come i neutrofili, che non sembrano esprimere CYP27B1, tendono a risentire degli effetti esercitati dai livelli circolanti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sintetizzata nei reni. Il VDR espresso sulle cellule Th sembra inoltre essere un potenziale target anche per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sistemica, sebbene siano stati proposti meccanismi intracrini. In modo analogo le cellule epiteliali, i trofoblasti e le cellule decidue sono in grado di rispondere in modo intracrina alla $25(\text{OH})\text{D}_3$, ma possono anche rispondere alla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sistemica per promuovere risposte antibatteriche.

Il legame storico tra vitamina D e funzione immune innata deriva inizialmente dall'uso dell'olio di fegato di merluzzo come trattamento per la tubercolosi [108]. Lavori più recenti si sono focalizzati sull'apparato cellulare e molecolare che sottende le azioni della vitamina D sul patogeno che causa la tubercolosi, il *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*). Nel primo di questi studi, condotto circa 25 anni fa, gli autori hanno mostrato che la forma attiva della vitamina D riduce la proliferazione del *M. tb* nei macrofagi e che quest'effetto è aumentato dall'interferone γ [109], uno stimolatore dell'enzima CYP27B1 macrofagico [110]. Studi più recenti hanno mostrato che i monociti/macrofagi promuovono l'attivazione localizzata di vitamina D in risposta al *M. tb*, con il legame di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ al VDR endogeno. In questo modo la vitamina D può agire modulando l'espressione genica in risposta ad un cambiamento immune indotto da *M. tb* – un classico meccanismo intracrino (Figura 14) [110, 112]. Bersagli potenziali per questa risposta intracrina includono la proteina antibiotica catelicidina che rappresenta un bersaglio trascrizionale diretto per il complesso $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR [113, 114]. Analisi funzionali hanno mostrato che l'induzione di catelicidina mediata da vitamina D coincide con un'aumento del killing del *M. tb* nei monociti/macrofagi. Questi studi hanno concluso che individui con bassi livelli sierici di $25(\text{OH})\text{D}_3$ saranno meno capaci di supportare l'induzione monocitaria dell'attività antibatterica e pertanto a rischio maggiore di infezione [112]. La supplementazione con vitamina D, in individui vitamina D insufficienti, determinando un incremento dell'induzione della catelicidina monocitaria, potrebbe aiutare a proteggere contro l'infezione.

La capacità di un ospite di combattere le infezioni da patogeni come *M. tb* non dipende esclusivamente da meccanismi antibatterici innati. Hewison M. e collaboratori hanno mostrato che citochine delle cellule T svolgono un ruolo importante sia nell'amplificazione che nell'attenuazione della produzione di catelicidina mediata da vitamina D [115].

La vitamina D può influenzare la risposta immune innata ai patogeni anche attraverso gli effetti sulla presentazione antigenica da parte di macrofagi e DC.

Il trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibisce la maturazione delle DC, sopprimendo la presentazione antigenica e promuovendo una risposta cellulare T tollerogena (Figura 15). Come i monociti anche le DC esprimono CYP27B1 così che sia la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ che la $25(\text{OH})\text{D}_3$ sono capaci di modulare la presentazione antigenica da parte della DC.

La capacità della vitamina D di influenzare la presentazione antigenica sottolinea pertanto il suo potenziale come un importante intermediario tra il sistema dell'immunità innata e quello dell'immunità adattativa [116]

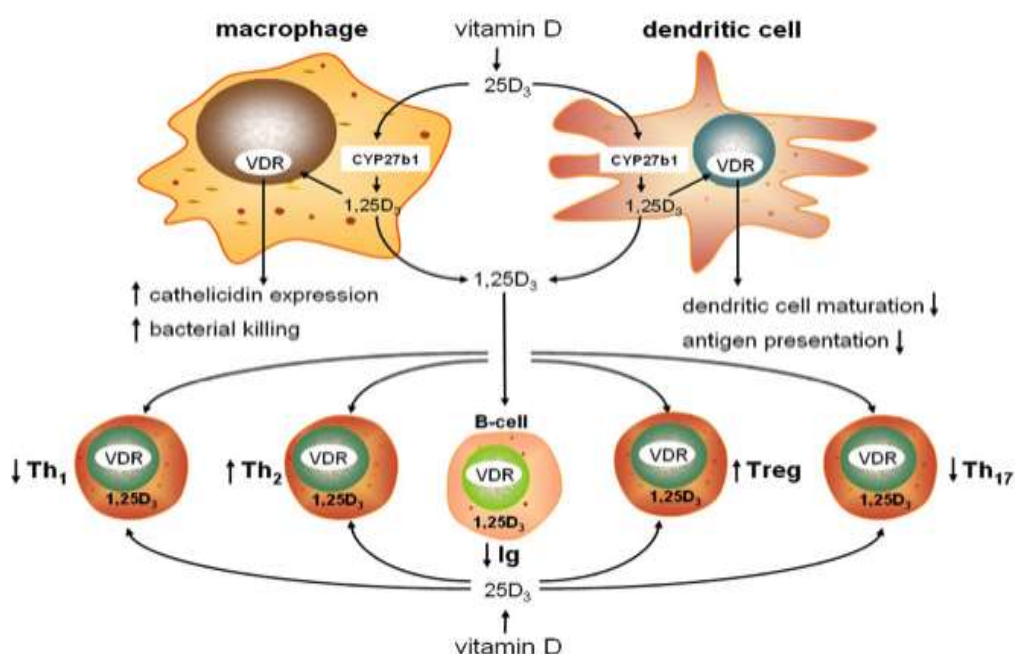


Figura 15. Effetti della vitamina D sul sistema immune (da Hewison 2010 [116]).

Vitamina D e DC

Le cellule dendritiche sembrano essere il bersaglio principale di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nell'ambito del sistema immunitario.

Studi in vitro hanno mostrato che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce nelle DC proprietà tollerogeniche che favoriscono l'induzione di cellule T regolatorie, capaci di sopprimere la risposta immunitaria [117].

Brennan e collaboratori hanno dimostrato che le DC isolate dai tessuti linfatici esprimono il recettore per la vitamina D e che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agisce attenuando la presentazione antigenica da parte di queste cellule [118]. Sia la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ che i suoi analoghi sintetici inibiscono la maturazione delle DC derivate dai monociti, sopprimendone pertanto la capacità di presentare l'antigene [119]. Questo fornisce un meccanismo mediante il quale la vitamina D potrebbe agire per promuovere la tolleranza immune e studi successivi hanno mostrato che la soppressione della maturazione delle DC da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è associata con un concomitante aumento delle cellule T soppressorie o regolatorie [120]. Il preciso meccanismo mediante il quale la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è capace di influenzare il fenotipo DC, la presentazione antigenica e la funzione cellulare T deve ancora essere definito e potrebbe coinvolgere meccanismi intracrinici (maturazione delle DC) o paracrinici (effetti diretti sulle cellule T che esprimono il VDR)(Figura 14) [121, 122].

A livello intracrinico, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ esercita effetti diversi sui due subset di cellule dendritiche circolanti, mieloidi (mDC) e plasmacitoidi (pDC); infatti, la vitamina D sembra regolare preferenzialmente le mDC, suggerendo che l'effetto principale in questo caso sia la soppressione dell'attivazione delle cellule T naive. Aggiuntivamente, la capacità di inibire lo sviluppo di cellule Th1 e di stimolare le cellule Treg sono attività indotte selettivamente dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle mDC, ma non nelle pDC.

Diversi studi hanno dimostrato che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e i suoi analoghi modificano profondamente sia il differenziamento che l'attivazione delle mDC, indirizzandole verso l'induzione di tolleranza [117, 123]; poiché le pDC sono cellule naturalmente tollerogeniche, l'assenza di modulazione da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potrebbe servire a lasciarne immutato il potenziale tollerogenico. Tuttavia, l'assenza di una risposta da parte delle pDC non preclude un ruolo della vitamina D su di esse; potrebbe infatti

essere che la produzione locale, piuttosto che l'aggiunta esogena, sia più efficace su queste cellule [122].

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibisce NF- κB , un fattore di trascrizione cruciale per le risposte infiammatorie e coinvolto nella differenziazione mieloidale delle cellule dendritiche. L'inibizione di NF- κB blocca l'espressione delle molecole MHC di classe II e delle molecole costimolatorie CD40, CD80 e CD86, diminuendo così la loro capacità di presentare l'antigene e attivare i linfociti T [124- 126]. Una conferma deriva da studi su modelli murini con deficit di VDR nei quali è dimostrato un aumentato numero di cellule dendritiche mature all'interno dei linfonodi drenanti della cute [127].

Questi effetti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulle DC portano come conseguenza un'alterazione della produzione di citochine: diminuzione di sintesi di IL-12 e IL-23, ed aumento di IL-10. Ne consegue una diminuzione della risposta dei linfociti Th1 e Th17 e un aumento di quella delle cellule T regolatrici di tipo 1 (linfociti TR1) che producono IL-10. Aumenta anche la produzione della chemochina MIP-3 α , anche conosciuta come CCL2, che interviene attivamente nel reclutamento dei linfociti T regolatori, che esprimono il CCR4 [128].

Quindi, conclusivamente, poiché le cellule dendritiche immature promuovono la tolleranza cellulare, mentre quelle mature attivano le cellule T naive, la vitamina D, attraverso l'inibizione della maturazione e della differenziazione delle DC, sembra portare alla formazione di cellule coinvolte in meccanismi di tolleranza cellulare ed inibire la formazione di cellule dendritiche coinvolte in meccanismi di difesa [117].

In contrasto con questi effetti inibitori, essa sembra giocare un ruolo importante nell'avvio della risposta immunitaria aumentando l'espressione del recettore per il mannosio, una molecola coinvolta nella cattura dell'antigene e correlata con un aumento della capacità di endocitosi [129]. Come per i macrofagi, le DC mostrano, durante la loro maturazione, una diminuzione del VDR. Questo ha il potenziale effetto positivo di assicurare che le DC mature siano relativamente insensibili alla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mantenendo la capacità di favorire una risposta T iniziale e stimolare l'immunità

acquisita. Allo stesso tempo, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ generata da queste cellule sarà in grado di agire sul VDR espresso sulle cellule dendritiche immature, limitandone l'ulteriore maturazione, che comporterebbe una conseguente sovra-stimolazione di cellule T (funzione autoregolatoria).

Vitamina D e linfociti T

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agisce sulle cellule T, sia direttamente che indirettamente, attraverso la regolazione della produzione di citochine determinanti per il differenziamento linfocitario.

Ci sono quattro potenziali meccanismi mediante i quali la vitamina D può influenzare la funzione cellulare T (Figura 14) [107]:

- 1) Effetti diretti sulle cellule T mediati dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sistemica;
- 2) Effetti indiretti sulla presentazione antigenica alle cellule T mediati dalle DC e dalla sintesi intracrina di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$;
- 3) Effetti diretti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulle cellule T in seguito alla sintesi della forma attiva di vitamina D da parte di monociti o DC (mediante un meccanismo paracrino);
- 4) Conversione intracrina di $25(\text{OH})\text{D}_3$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ da parte delle cellule T.

In un'ampia serie di lavori è stato dimostrato che, nell'uomo, concentrazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ comprese tra 10^{-12}M e 10^{-8}M sono capaci di inibire la proliferazione cellulare T, indotta da stimolazione antigenica o da leptina, la secrezione di IL-12 e la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase G2 [130- 132]. L'intensità di questa inibizione si è rivelata essere alquanto variabile e in alcuni studi sembra poter essere parzialmente o completamente superata dall'aggiunta di IL-12 o di stimoli più potenti.

Anche se il VDR è espresso a livelli comparabili nelle cellule CD4⁺ e in quelle CD8⁺, le cellule CD4⁺ sembrano essere il target preferenziale dell'inibizione mediata dalla vitamina D durante l'attivazione primaria in vitro.

L'effetto complessivo della vitamina D sulle cellule T è quello, da un lato di bloccare la produzione di citochine promuoventi i linfociti Th1, in particolare IFN- γ e IL-12, dall'altro di promuovere le risposte dei linfociti Th2, sia direttamente, aumentando la produzione di IL-4, IL-5 e IL-10, sia indirettamente, riducendo la produzione di IFN- γ e IL-12. Inoltre, la 1,25(OH)₂D₃, diminuendo la produzione di IL-6 e IL-23, inibisce la risposta dei linfociti Th17 e induce la differenziazione e/o l'espansione dei linfociti T reg CD4⁺CD25⁺, che esprimono alti livelli di CTLA-4 e FoxP3 (cellule in grado di mediare la tolleranza)[124, 127]. Inoltre, la 1,25(OH)₂D₃ può rafforzare l'attività soppressoria delle cellule Treg e promuoverne la migrazione a siti infiammatori.

La 1,25(OH)₂D₃ interviene anche direttamente inibendo la capacità dei linfociti Th17 e dei linfociti T-FH (cellule che stimolano i linfociti B nei centri germinativi) di produrre IL-21 [133].

Poiché l'espressione del VDR nelle cellule T è aumentata durante la loro attivazione, l'azione diretta sulle cellule T sembrerebbe rappresentare per la vitamina D una via aggiuntiva di intervento nel loro differenziamento.

La 1,25-diidrossivitamina D inibisce la produzione da parte dei linfociti T di IL-2, bloccando la formazione del fattore di trascrizione NF-AT e dell'IFN- γ , attraverso l'interazione del complesso VDR-ligando con un VDRE, posto nel promotore di questa citochina [125].

Gli effetti inibitori diretti della 1,25(OH)₂D₃, sono più pronunciati a livello delle cellule T della memoria e delle cellule effettrici, in quanto queste cellule hanno un maggior numero di VDR rispetto alle cellule naive [128].

Vitamina D e Linfociti T $\gamma\delta$

La vitamina D sembra svolgere molteplici attività anche sui linfociti T $\gamma\delta$. Chen L. e collaboratori hanno dimostrato che, a seguito dell'attivazione da parte dell'isopentenilpirofosfato (IPP), si verifica una sovra-regolazione del VDR all'interno dei linfociti T $\gamma\delta$, attraverso una via che coinvolge la proteina chinasi C (PKC). La sovra-regolazione del VDR e l'interazione con la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, riduce la produzione di INF- γ e inibisce l'attivazione delle cellule T $\gamma\delta$ indotta dall'antigene fosfato, come determinato dalla ridotta espressione del CD25 (il recettore ad alta affinità per l'IL-2) e dall'inibizione dose-dipendente dell'espansione indotta dall'antigene. A concentrazioni molto elevate la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sembrerebbe inoltre potenziare la morte cellulare antigene-indotta, probabilmente sempre attraverso la riduzione dell'espressione di CD25 [134].

Vitamina D e linfociti B

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha effetti potenti e diretti anche sulla risposta cellulare B, determinando inibizione della proliferazione, generazione di cellule B memoria, differenziazione in plasmacellule e produzione di immunoglobuline e determinando induzione di apoptosi. Questi effetti erano ritenuti inizialmente secondari agli effetti sulle APC e sui linfociti T. Recentemente è stato dimostrato che anche i linfociti B esprimono il VDR e possono sintetizzare l'ormone attivo che può esercitare azioni regolatorie autocrine e paracrine. Questi effetti supportano l'ipotesi che la vitamina D possa avere un ruolo nei disordini autoimmuni correlati alle cellule B, come il lupus eritematoso sistemico (LES) [107].

1.4.7 Prodotti utilizzabili per la supplementazione con vitamina D

Il prodotto ideale per la prevenzione dell'ipovitaminosi D nel bambino dovrebbe contenere preferibilmente solo vitamina D.

La supplementazione di vitamina può essere effettuata a cadenza giornaliera, settimanale, mensile o annuale. Per ottimizzare la compliance, la vitamina D dovrebbe

essere somministrata nello stesso momento della giornata, con le stesse modalità ed in un'unica somministrazione.

La via di somministrazione preferita è quella orale, la terapia per via intramuscolare è indicata solo in caso di sindromi da malassorbimento.

Le formulazioni non dovrebbero contenere quantità troppo elevate di vitamina D per ridurre gli effetti tossici di una eventuale ingestione accidentale del prodotto da parte del bambino.

In Tabella 9 sono riportati alcuni prodotti, riportati sul prontuario farmaceutico o classificati come integratori, che possono essere impiegati per la prevenzione dell'ipovitaminosi D.

Poiché le tappe metaboliche di attivazione della vitamina D sono perfettamente funzionanti nell'individuo sano, non c'è alcuna indicazione all'impiego dei metaboliti della vitamina D per la prevenzione dell'ipovitaminosi D. Pertanto, è assolutamente da evitare l'uso di questi preparati (calcifediolo, alfacalcidolo, calcitriolo, diidrotachisterolo), in quanto possono causare l'insorgenza di intossicazione con ipercalcemia (anche sintomatica) oltre a non modificare lo stato vitaminico D [135].

Tabella 4. Prodotti utilizzati per la supplementazione con vitamina D.

PRODOTTO	FORMA DI VITAMINA D	FASCIA S.S.N.	ALTRE VITAMINE O COMPOSTI
Abidec	Ergocalciferolo	C	Polivitaminico
Adisterolo	Colecalciferolo	C	Vitamina A
AD Pabyrn	Colecalciferolo	C	Vitamina A
Decodi	Colecalciferolo	Integratore	Vitamine A, E; DHA
Decodi K	Colecalciferolo	Integratore	Vitamine K, A, E; DHA
Dediol	α -calcioliolo	A	-
Di Base	Colecalciferolo	A	-
Dicovit D	Colecalciferolo	Integratore	-
Dicovit DK	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina K
Ditreol	Colecalciferolo	Integratore	DHA
Ditreol Kappa	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina K, DHA
Ditrevit	Colecalciferolo	Integratore	Vitamine A, E; DHA
Ditrevit K50	Colecalciferolo	Integratore	Vitamine K, A, E; DHA
Enavitamin	Colecalciferolo	Integratore	Polivitaminico, DHA
FluorD ₃	Colecalciferolo	Integratore	Fluoro
Haliborange	Colecalciferolo	Integratore	Vitamine A, C
Idroplurivit	Colecalciferolo	C	Polivitaminico
Idroplurivit Baby	Colecalciferolo	Integratore	Polivitaminico
Lutein D ₃	Colecalciferolo	Integratore	Luteina, Zeaxantina, DHA
3 Mil	Colecalciferolo	Integratore	Vitamine K, B6
NeoDi	Colecalciferolo	Integratore	-
NeoKD	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina K
Panavit-zero	Colecalciferolo	Integratore	Polivitaminico
PediaCal	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina A, ω 3, ω 6
PediaKD	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina K
PediaTre	Colecalciferolo	Integratore	-
PediaVit	Colecalciferolo	Integratore	Polivitaminico
Proton	Colecalciferolo	Integratore	-
Proton Infant DK	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina K
Protovit	Colecalciferolo	C	Polivitaminico
Rocaltrol	Calcitriolo	A	-
Sanivit AD	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina A
Sanivit DK	Colecalciferolo	Integratore	Vitamina K
VitaUno	Colecalciferolo	Integratore	Polivitaminico, zinco
VitaDue	Colecalciferolo	Integratore	Polivitaminico
VitaTre	Colecalciferolo	Integratore	Polivitaminico

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 SOGGETTI

Lo studio è stato condotto su un gruppo di 12 pazienti in età pediatrica (età media: 8,2 anni), con diagnosi di Sindrome di DiGeorge, afferenti all'Unità Operativa di Pediatria (Direttore Prof. Giuseppe Saggese) del dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Pisa.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono descritte nella Tabella 5.

Sono stati arruolati inoltre, come controlli, 12 soggetti sani scelti nello stesso range di età dei pazienti.

Tabella 5. Caratteristiche cliniche dei pazienti.

Paziente	Sesso	Età	Facies	Disturbi cardiaci	Disturbi di apprendimento	Iparatiroidismo	Morbilità frequente	Malattie autoimmuni	Cancro
1	M	8	Si	Si	Grave	No	Si	No	No
2	M	5	Si	Si	Si	No	Si	No	No
3	M	9	Si	Si	Si	No	No	No	No
4	F	18	No	Si	Medio	Si	No	No	No
5	F	9	Si	No	Grave	Si	No	Si	No
6	M	8	No	No	No	Si	No	Si	No
7	M	5	Si	Si	Lieve	Si	Si	No	No
8	F	12,5	Si	Si	Lieve	Si	No	No	No
9	F	10	Si	Si	Lieve	No	No	No	No
10	M	12,5	Si	Si	Lieve	No	Si	No	Si
11	M	8,5	Si	Si	Lieve	No	No	No	No
12	F	4,5	Si	No	Si	No	No	No	No

2.2 STATO VITAMINICO D

Lo stato vitaminico D è stato valutato in base ai livelli circolanti di 25(OH)D₃ in relazione ai cut-off di riferimento proposti dall'Endocrine Society [136]; sono considerati deficienti in vitamina D tutti i soggetti con livelli di 25(OH)D₃ < 20 ng/ml). Sulla base dello stato vitaminico D, i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: il gruppo A (4 pazienti) con livelli di 25(OH)D₃ nella norma, il gruppo B (4 pazienti) con livelli di 25(OH)D₃ inferiori a 20 ng/ml e il gruppo C (5 pazienti) costituito da pazienti affetti da ipoparatiroidismo e pertanto in trattamento con calcio e vitamina D.

La determinazione quantitativa della 25(OH)D₃ nel siero è stata effettuata presso il laboratorio di Medicina Nucleare dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana (Direttore Prof. Giuliano Mariani) mediante il kit 25-idrossivitaminaD ¹²⁵I RIA (DiaSorin). La determinazione quantitativa della 1,25(OH)₂D₃ nel siero è stata effettuata nello stesso laboratorio mediante il kit 1,25-diidrossivitaminaD ¹²⁵I RIA (DiaSorin).

2.3 SCHEMA TERAPEUTICO

2.3.1 Gruppo B

Tre pazienti su quattro sono stati supplementati secondo lo schema della

Tabella 6. Di questi pazienti l'indagine immunologica è stata effettuata prima del trattamento (basale) e a distanza di un mese dal trattamento.

Tabella 6. Supplementazione con Vitamina D

Pazienti	Trattamento		
	Specialità medicinale	Principio attivo	Dose e modalità di somministrazione
1	Di Base 10.000 U.I.	colecalfiferolo	2 gtt/die (500 U.I./die) continuativamente per os
2	Di Base 25.000 U.I.	colecalfiferolo	1 flaconcino monodose (0,650 mg)/mese per os
3	Di Base 25.000 U.I.	colecalfiferolo	1 flaconcino monodose (0,650 mg)/settimana per un mese, poi un flaconcino/mese per os

2.3.2 Gruppo C

I pazienti, al momento dello studio, erano tutti in trattamento da almeno 2 anni, secondo lo schema della Tabella 7.

Tabella 7. Trattamento dei pazienti con ipoparatiroidismo

Pazienti	Trattamento		
	<i>Specialità medicinale</i>	<i>Principio attivo</i>	<i>Dose e modalità di somministrazione</i>
1	Rocaltrol	1,25(OH) ₂ D ₃	1 Cps da 0,25 mcg due volte/die
2	Nd	nd	Nd
3	Rocaltrol	1,25(OH) ₂ D ₃	1 Cps da 0,25 mcg due volte/die
4	Dediol	1,25(OH) ₂ D ₃	17 gtt (0,650 mcg) al giorno
5	Rocaltrol	1,25(OH) ₂ D ₃	1 Cps da 0,50 mcg due volte/die

2.4 LA CITOFLUORIMETRIA

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette la caratterizzazione cellulare attraverso la valutazione multiparametrica di caratteristiche biofisiche ed antigeniche di singole cellule in sospensione. I dati che si ricavano sono sia di tipo qualitativo che quantitativo.

Nei citofluorimetri a flusso, sospensioni di cellule marcate con sostanze fluorescenti vengono convogliate in un capillare da un sistema fluidico laminare di trasporto. In queste condizioni idrodinamiche le cellule viaggiano all'interno del capillare in maniera separata ed ordinata fino ad un punto in cui un fascio di luce focalizzata, emessa da un laser, intercetta il flusso cellulare generando segnali che vengono poi amplificati, convertiti in segnali digitali ed elaborati da un "analizzatore multicanale" che provvede alla loro rappresentazione in tempo reale su un display.

I segnali originati sono solitamente di tre tipi:

- **Forward scatter** (FS): è il segnale originato dalla luce diffratta frontalmente; la sua intensità è legata alla dimensione delle cellule.
- **Side scatter** (SS): è il segnale originato dalla luce riflessa a 90°; la sua intensità è legata alla granulosità e/o alla complessità cellulare.
- **Fluorescenza**: è il segnale originato dall'eccitazione dei fluorocromi. Utilizzando anticorpi monoclonali coniugati a composti fluorescenti è possibile identificare le singole cellule analizzate in base a marcatori antigenici di superficie riconosciuti dall'anticorpo. La presenza di uno specifico antigene su una cellula, viene perciò rilevata ed utilizzata sia come indicatore dell'appartenenza di questa ad una data popolazione cellulare che del suo stadio di maturazione. In una popolazione cellulare mista quindi, i differenti fluorocromi possono essere utilizzati contemporaneamente per identificare diverse popolazioni e sottopopolazioni cellulari. Alcuni dei fluorocromi più utilizzati sono:
 - **isotiocianato di fluoresceina** (FITC), che emette un segnale di fluorescenza verde a 525 nm;
 - **ficoeritrina** (PE), che emette un segnale di fluorescenza rosso a 575 nm;
 - **ficoeritrina cianina** (PC5), che emette un segnale di fluorescenza rosso intenso a 675 nm.

I dati raccolti vengono graficamente rappresentati attraverso istogrammi o, più comunemente, attraverso diagrammi a dispersione di punti (DOT-PLOT). In questo secondo tipo di rappresentazione, che è detta bidimensionale a parametri correlati, ogni punto rappresenta un singolo evento caratterizzato da un valore tipico per ciascun parametro riportato sugli assi cartesiani. Un particolare tipo di DOT-PLOT è il COLOR-PLOT, dove gli eventi si evidenziano come singoli punti e il colore cambia a seconda del numero di eventi con le stesse caratteristiche [137].

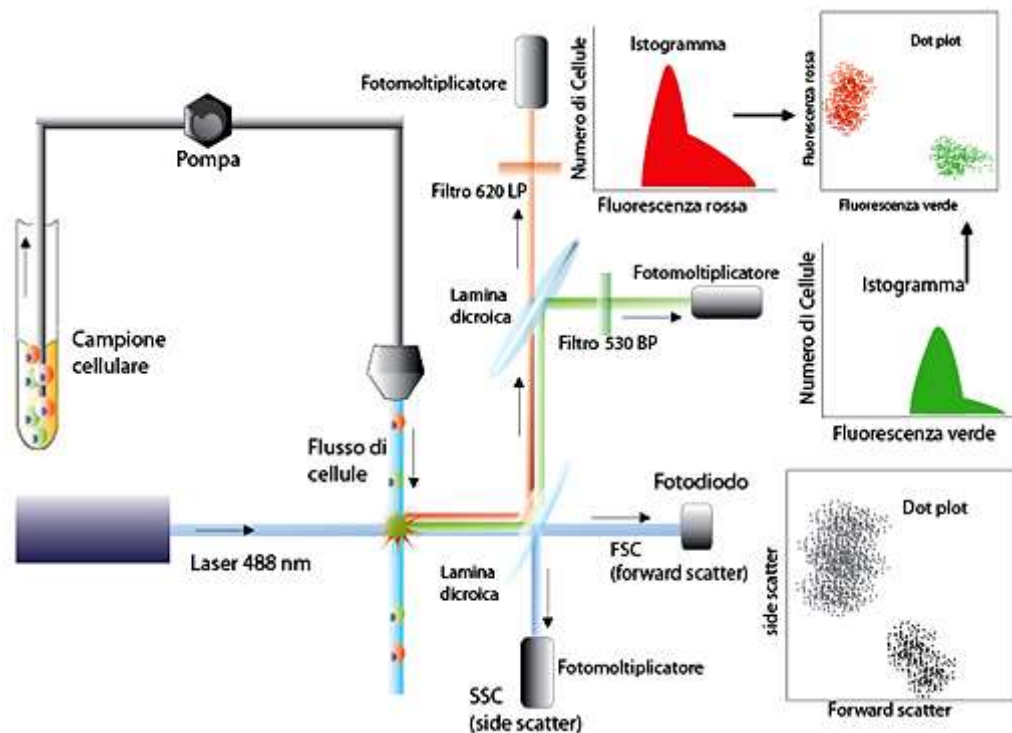


Figura 16. Schema di funzionamento del citofluorimetro a flusso

All'interno del DOT-PLOT si possono inoltre definire i cosiddetti GATE, ovvero delle finestre elettroniche che ci permettono di isolare una determinata popolazione da tutte le altre cellule e di analizzare i parametri successivi solo all'interno di tale popolazione, dividendola così in ulteriori subpopolazioni [137].

2.5 CARATTERIZZAZIONE CITOFLUORIMETRICA “EX VIVO” DELLE DC MIELOIDI E PLASMACITOIDI DA SANGUE PERIFERICO

Le cellule dendritiche mieloidi e plasmacitoidi circolanti vengono individuate e conteggiate direttamente sul campione di sangue intero, mediante l'impiego della citometria a flusso multiparametrica.

Per ogni campione di sangue periferico dei pazienti in esame e dei soggetti sani da sottoporre ad analisi citofluorimetrica, sono state allestite 3 provette: una, “bianca”, per

escludere l'autofluorescenza delle cellule, una per la determinazione delle mDC e una per la determinazione delle pDC.

La lavorazione dei campioni è avvenuta tramite un'iniziale incubazione di 100 µl di sangue intero, raccolto in provette contenenti EDTA, con 10 µl di una miscela specifica di anticorpi coniugati per le DC mieloidi e plasmacitoidi per 20 minuti, a temperatura ambiente e al riparo dalla luce,.

Le miscele di anticorpi coniugati utilizzate per questo lavoro sono così costituite:

ANTICORPI CONIUGATI PER LE DC MIELOIDI	ANTICORPI CONIUGATI PER LE DC PLASMACITOIDI
<ul style="list-style-type: none"> •CD14-CD16-FITC •CD84K-PE •CD33-PC5 	<ul style="list-style-type: none"> •CD14-CD16-FITC •CD85K-PE •CD123-PC5

Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 2 ml di soluzione lisante Versalyse (Immunotech SAS; Marseille, Francia) e si è proceduto ad una seconda incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Seguono quindi 2 lavaggi con una soluzione salina, al termine dei quali le cellule sono state risospese in un ml della stessa soluzione ed analizzate mediante il citofluorimetro EPICS XL (Beckman Coulter Inc.).

La strategia di gating utilizzata in questo studio, illustrata in Figura 17, per l'individuazione delle cellule dendritiche mieloidi e plasmacitoidi circolanti è stata la seguente:

- abbiamo riportato sugli assi cartesiani il FS contro il SS, ottenendo un grafico che ci ha permesso di discriminare tra diverse popolazioni cellulari, basandoci esclusivamente sulle loro caratteristiche fisiche. Poiché le DC circolanti possiedono parametri di FS ed SS simili a quelli dei linfo-monociti, abbiamo costruito un gate (B) che includesse solo le cellule mononucleate periferiche (PBMC), lasciando fuori granulociti e detriti. In ragione della bassa

concentrazione di DC nel sangue, abbiamo scelto di acquisire un numero elevato di eventi, pari a 50.000, nel gate B.

- il secondo COLOR-PLOT riporta in ascisse il SS e in ordinata l'antigene CD33 per il subset mieloide e l'antigene CD123 per il subset plasmacitoide. Anche in questo grafico abbiamo costruito un gate, che questa volta includeva esclusivamente le cellule CD33⁺ (Cm) o CD123⁺ (Cp);
- nel terzo COLOR-PLOT viene esaminata l'espressione delle molecole CD85K, CD14 e CD16 e viene costruito un gate che comprenda le cellule positive per l'antigene CD85K e negative, o a bassa intensità di espressione, per gli antigeni CD14 e CD16 (gate Dm e Dp);
- nel quarto ed ultimo COLOR-PLOT riportiamo in grafico l'antigene CD85K verso l'antigene CD33 (per le mDC) o CD123 (per le pDC), andando finalmente ad individuare le mDC nel gate Em e le pDC nel gate Ep entrambi caratterizzati dalla presenza di cellule positive per entrambi gli antigeni.

I dati così ottenuti ci hanno permesso di determinare la percentuale di cellule positive per ciascun marcatore e l'intensità media della fluorescenza (MFI).

Il numero assoluto delle mDC e delle pDC è stato poi calcolato moltiplicando la percentuale delle DC nel gate delle cellule mononucleate per il numero assoluto delle cellule mononucleate, determinato grazie all'uso di uno strumento contaglobuli (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL, USA).

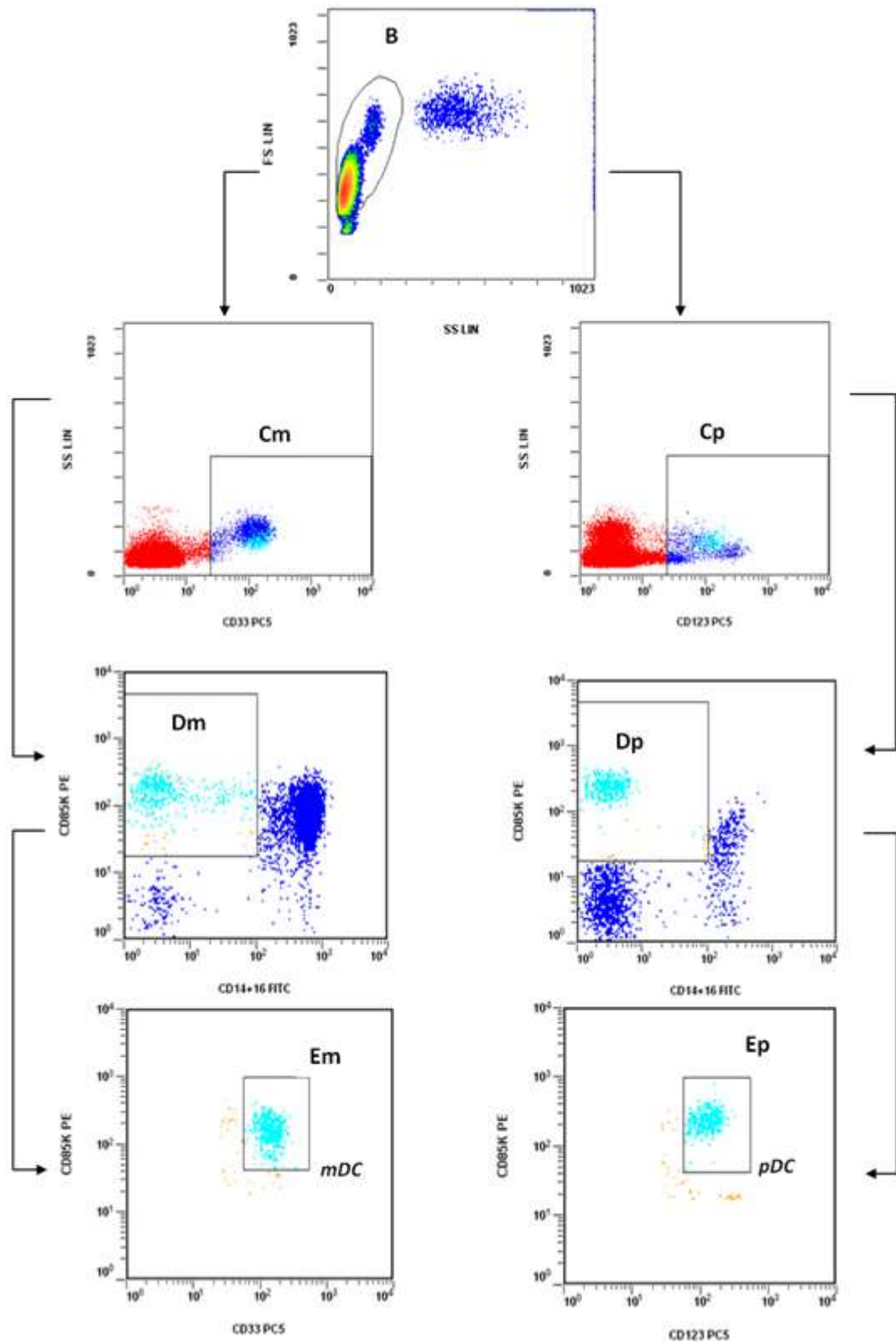


Figura 17. Strategia di gating per la determinazione delle DC circolanti.
mDC = DC mieloidi, pDC = DC plasmacitoidi

2.6 GENERAZIONE “IN VITRO” DI CELLULE DENDRITICHE A PARTIRE DA MONOCITI CIRCOLANTI

Le DC sono state generate, in ambiente sterile, a partire da monociti umani isolati da sangue periferico eparinato in presenza di GM-CSF e IL-4 ed indotte alla maturazione per aggiunta di LPS. Per la purificazione dei monociti è stato utilizzato il sistema immunomagnetico (MiniMACS, Miltenyi Biotec) con relativo CD14 Isolation Kit (Miltenyi Biotec), che prevede la selezione positiva di cellule CD14⁺, come descritto dalla casa produttrice.

Per ottenere le cellule mononucleate (linfociti e monociti), il sangue periferico in litioeparina è stratificato delicatamente su gradiente di densità Ficoll-Hypaque (Lympholyte-H, Cedarlane Laboratories Ltd; Burlington, Ontario, Canada) e successivamente centrifugato a 500g per 20 minuti a temperatura ambiente e senza freno.

La miscela di Ficoll-Hypaque è costituita da un destrano ad alto peso molecolare (400 KD) ottenuto dalla copolimerizzazione del saccarosio con l'epicloridrina e dal diatrizoato sodico (Figura 18).

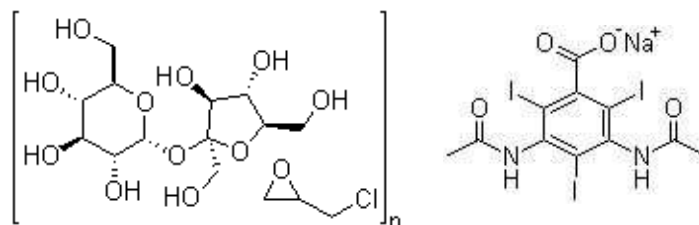


Figura 18. Molecole di Ficoll (destra) e diatrizoato sodico (sinistra)

Il destrano ha la capacità di provocare una pseudo-agglutinazione degli eritrociti per modificazioni della carica elettrica di superficie, mentre il sodio diatrizoato, che è un composto iodato usato spesso in radiologia come mezzo di contrasto, grazie all'alta osmolalità che lo caratterizza, è in grado di realizzare delle soluzioni ad alta densità. Stratificando il sangue su tale miscela e centrifugando, le particelle sedimentano in

funzione della loro densità. Si verranno quindi a creare fasi distinte, contenenti diversi tipi cellulari (Figura 19): gli eritrociti, dotati di maggiore densità ed aggregati dal destrano, attraversano lo strato di ficoll e si depositano sul fondo della provetta; immediatamente sopra si forma una sottile patina biancastra formata dai granulociti, mentre le cellule mononucleate, che sono meno dense del gradiente, si depositano all'interfaccia tra il plasma ed il polimero formando un anello lattiginoso.

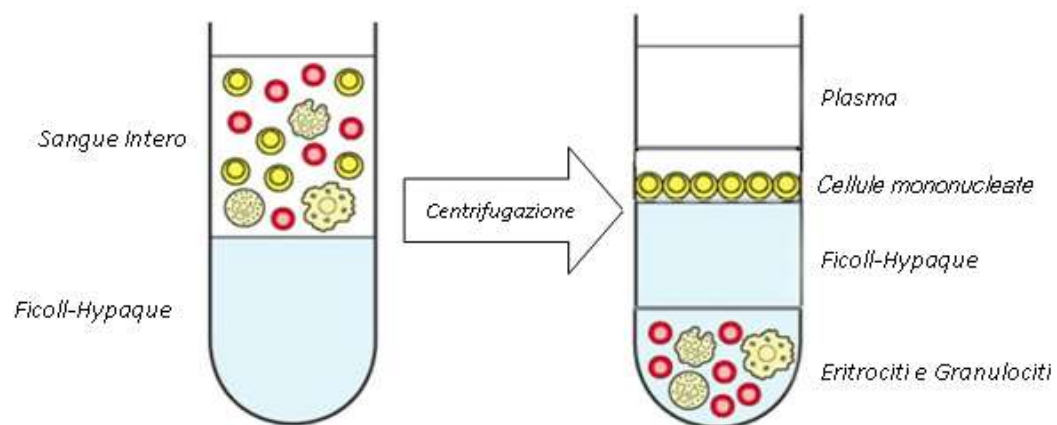


Figura 19. Isolamento delle cellule mononucleate per centrifugazione differenziale

Si raccolgono le cellule mononucleate, si effettuano 2 lavaggi con PBS sterile e si risospendono le cellule in un appropriato volume di buffer costituito da PBS sterile supplementato con lo 0,5% di siero fetale bovino (SVF; Euroclone SpA, Pavia, Italia) e con 2 mM di EDTA (Sigma-Aldrich Co.). Poiché la metodica di separazione MACS prevede la sospensione di 10^7 cellule in 80 μ l di buffer insieme a 20 μ l di microbiglie magnetiche coniugate con un anticorpo monoclonale murino anti-CD14 umano (o volumi multipli di buffer e biglie per concentrazioni cellulari maggiori di 10^7), si procede alla conta cellulare nella camera di Neubauer. Si centrifuga, si rimuove il surnatante ed in base al numero di cellule ottenute si risospende il pellet nell'opportuna quantità di buffer; si aggiunge quindi la quantità appropriata di microbiglie e si lascia la sospensione ad incubare per 15 minuti a 4°C. Segue un lavaggio con un volume di

buffer pari a 10-20 volte il volume della sospensione, in seguito al quale si rimuove il surnatante e si risospende il pellet in 500 μ l o 3 ml di buffer, a seconda del tipo di colonna che si vuole utilizzare. Infatti, in base al numero iniziale di cellule, vengono utilizzate appropriate colonne di tipo MS⁺/RS⁺ (per un massimo di 10⁷ cellule) o LS⁺/VS⁺ (per un massimo di 10⁸ cellule) (Figura 20).

Si procede quindi con la separazione immunomagnetica: questa tecnica si avvale dell'utilizzo di microbiglie supermagnetiche sulle quali sono adsorbiti anticorpi diretti contro l'antigene CD14. L'uso di tali particelle, assieme ad un magnete, permette di isolare dalla sospensione solamente le cellule legate agli anticorpi.

La procedura inizia ponendo la colonna nel campo magnetico del separatore MACS e lavandola con un appropriato volume di buffer (500 μ l per colonne MS⁺/RS⁺, 3 ml per colonne LS⁺/VS⁺). Si procede quindi con il passaggio delle cellule: le CD14⁻ vengono eluite, mentre le CD14⁺ sono trattenute dal campo magnetico in quanto coniugate con le microbiglie anti-CD14.



Figura 20. Separatori immunomagnetici MiniMACS® e MidiMACS® Miltenyi

Al termine dell'eluizione la colonna viene lavata per tre volte con il buffer freddo, staccata dal separatore MACS e posta su una provetta. Le cellule CD14⁺ sono

recuperate ponendo un volume di buffer pari a 1 ml per colonne MS⁺/RS⁺ e 5 ml per colonne LS⁺/VS⁺ sulla colonna ed esercitando una pressione con l'apposito pistone. La procedura di separazione è schematizzata in Figura 21.

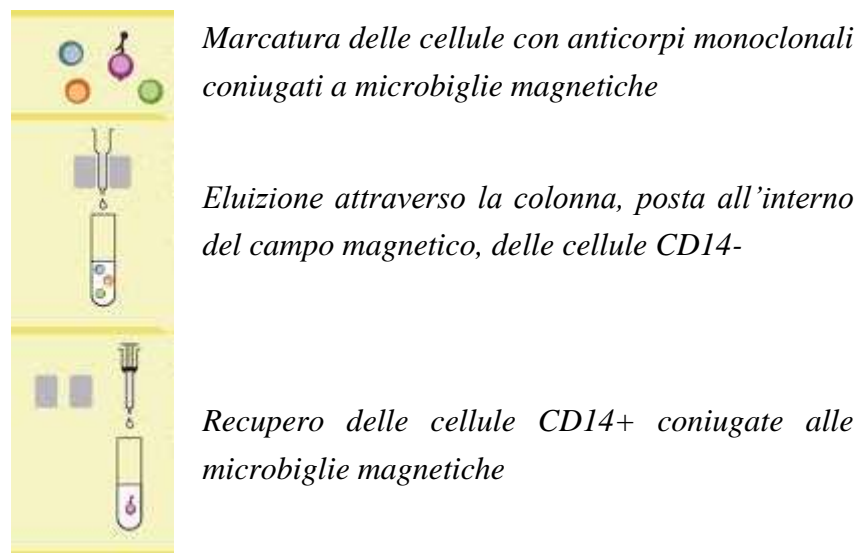


Figura 21. Schematizzazione del processo di immunoseparazione magnetica

I monociti (CD14⁺) così ottenuti, sono contati e sospesi ad una concentrazione cellulare di 1×10^6 /ml in un terreno completo per DC costituito da RPMI 1640 (Gibco Laboratories; Grand Island, NE, USA) supplementato con il 10% di SVF, L-glutammina 2 mM (Euroclone SpA), streptomina 100 µg/ml, penicillina 100 UI/ml (Sigma-Aldrich Co.) e coltivati in presenza di GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (50 ng/ml) (PeproTech Inc; Rocky Hill, NJ, USA). Al sesto giorno di coltura, nelle condizioni descritte, a 37°C e 5% CO₂, i monociti sono differenziati in una popolazione omogenea di DC ad uno stadio di sviluppo immaturo. La maturazione viene indotta mediante aggiunta, direttamente nel pozzetto originale, di LPS (Sigma-Aldrich Co) alla concentrazione non tossica di 100 ng/ml e la piastra viene lasciata in incubazione per ulteriori 48 ore. Al termine del periodo differenziativo-maturativo, le cellule vengono recuperate dalle colture staccandole con soluzione salina fredda. Dopo lavaggio (300g

per 10 minuti) le cellule sono contate al microscopio con trypan blue per la valutazione della vitalità e utilizzate per la caratterizzazione fenotipica e funzionale.

2.7 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

L'analisi fenotipica è effettuata mediante citometria a flusso (Epics XL; Beckman Coulter Ink.) previa marcatura delle DC immature e mature con anticorpi monoclonali specifici, direttamente coniugati con PE o con FITC.

Nello specifico, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: anti-CD14-FITC (Immunotools, Friesoythe, Germany), anti-CD40-PE (Instrumentation Laboratory), anti-CD80-FITC (Instrumentation Laboratory), anti-CD83-PE (Instrumentation Laboratory), anti-HLA-DR-FITC (Immunotools, Friesoythe, Germany).

- Il **CD14** è un recettore ad alta affinità per l'LPS e per la proteina legante l'LPS; è fortemente espresso su monociti e macrofagi, debolmente su linfociti B e neutrofili e del tutto assente su altri tipi cellulari. L'espressione della proteina CD14 viene persa durante il processo differenziativo delle DC, pertanto la valutazione della sua assenza è utilizzata come indice di generazione delle DC.
- Il **CD40** è una proteina trans-membrana che presenta analogie con il recettore del TNFK. La sua espressione è up-regolata in seguito alla maturazione delle DC. La sua attivazione può indurre maggiore capacità da parte delle DC nella presentazione dell'antigene, nella produzione di citochine e nell'espressione di molecole costimolatorie che spingono i linfociti T ad espandersi e differenziare.
- Il **CD80** è una proteina transmembrana omodimerica costituita a partire dall'N-terminale da due domini Ig, una regione transmembrana idrofobica e una coda citoplasmatica. Il suo legame al CD28, presente sulla superficie dei linfociti T, induce la sintesi di proteine anti-apoptotiche, citochine e fattori di crescita, favorendo quindi la crescita e la proliferazione dei linfociti T. Analogamente al CD40 la sua espressione sulla superficie delle DC aumenta all'avanzare dello stadio maturativo della cellula.

- **CD83**: la sua funzione non è ancora stata stabilita con chiarezza, ma è indicato come marker di maturazione, in quanto la sua espressione segna il completamento del processo di transizione da un tipo di DC immatura ad un tipo pienamente maturo.
- **HLA-DR** è una molecola appartenente al complesso maggiore di istocompatibilità umano di classe II, espressa da tutte le cellule che funzionano da APC; è up-regolata in seguito alla cattura, alla processazione e all'esposizione dell'antigene sulla superficie della cellula.

Il nostro protocollo di indagine fenotipica delle DC prevede, al giorno +6 di coltura, la valutazione dell'espressione degli antigeni CD14 e HLA-DR e, al giorno +8 di coltura, dopo aggiunta dello stimolo maturativo, la valutazione dell'espressione degli antigeni CD40, CD80, CD83 e HLA-DR. Per ogni campione in esame è inoltre allestito in parallelo un campione "bianco" (non marcato con anticorpi monoclonali), per escludere l'eventuale autofluorescenza delle cellule.

Per l'immunofenotipizzazione, si recuperano le cellule dal pozzetto, si centrifugano e si allontana il surnatante; si risospende un'aliquota di circa 10^4 cellule in un appropriato volume di PBS supplementato con lo 0,05% di NaN_3 (Sigma-Aldrich Co.) e lo 0,2% di SVF e si effettua un lavaggio. Si risospende nuovamente il pellet in un adeguato volume di PBS- NaN_3 -SVF e si incubano 100 μl di tale sospensione cellulare con 10 μl di ognuno degli anticorpi monoclonali presi in esame, per 20 minuti a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce. Al termine dell'incubazione si effettua un lavaggio in PBS- NaN_3 -SVF, si risospende in 400 μl della stessa soluzione e si esegue la lettura al citofluorimetro. Il gate di acquisizione (50.000 eventi) viene posto secondo i parametri fisici (FSC verso SSC) ed è valutata l'espressione dei vari antigeni, determinando sia la percentuale di cellule positive sia l'intensità di fluorescenza.

2.8 CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE: ENDOCITOSI RECETTORE MEDIATA DI FITC-DESTRANO

La capacità di internalizzare l'antigene, tipica del subset DC immaturo, è stata indagata attraverso il saggio di "endocitosi recettore mediata di FITC-destrano".

L'attività endocitotica delle DC, mediata dal recettore per il mannosio, è valutata, mediante analisi citofluorimetrica al giorno di coltura +6, come up-take di FITC-destrano, in quanto tale sostanza mostra una elevata affinità per questo recettore.

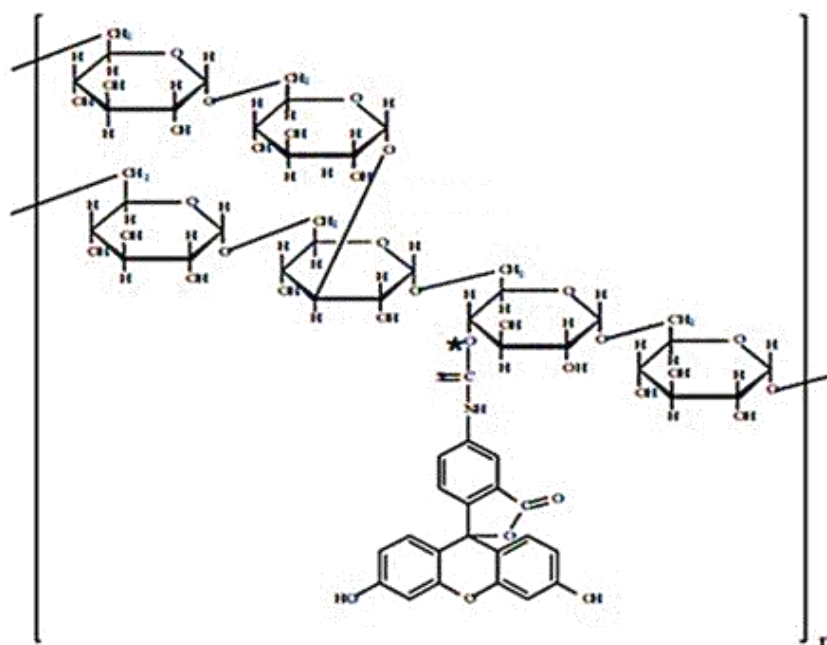


Figura 22. Struttura del FITC-destrano.

La soluzione di FITC-destrano è preparata alla concentrazione di 2 mg/ml in RPMI-1640 supplementato con il 10% di SVF e mantenuta al riparo dalla luce ed in congelatore, a -20°C.

Le cellule dendritiche immature sono risospese in RPMI supplementato con il 5% di SVF, alla concentrazione di 10^6 cellule/ml. Per ciascun campione, sono utilizzati 500 μ l della sospensione cellulare e le provette sono poste per 30 minuti in incubatore a 37°C

al 5% di CO₂. Per ogni campione è previsto un controllo, processato in parallelo ma posto a 0°C, in cui viene misurata la quantità di antigene coniugata in maniera aspecifica alla superficie cellulare. Un aliquota di 500 µl di FITC-destrano (Figura 22) viene aggiunta a ciascun campione, previo riscaldamento per 30 minuti a 37°C. Le provette sono quindi vortexate e poste per 60 minuti a 37°C e al 5% CO₂, mentre le provette controllo sono vortexate e poste in ghiaccio per lo stesso periodo di tempo.

Al termine del periodo di incubazione, si effettuano due lavaggi in PBS freddo, per bloccare l'endocitosi ed eliminare il FITC-destrano in eccesso. Il pellet viene quindi risospeso in 300 µl di PBS e addizionato con 1% di formalina (Bio Optica Milano SpA, Milano, Italia). Si procede dunque con l'analisi citofluorimetrica che rivela, attraverso l'intensità della fluorescenza, la quantità di cellule che hanno fagocitato la molecola di FITC-destrano.

I risultati sono espressi come differenza tra l'intensità media di fluorescenza misurata nel campione incubato a 37°C e quella misurata nel campione incubato in ghiaccio.

2.9 SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE T, B, NKT E CELLULE NK

L'analisi fenotipica è effettuata presso il Laboratorio di Ematologia (Dott. Giancarlo Carulli) del dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale. Per monitorare i linfociti T e l'attività timica sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: CD45, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD62L, TCR αβ, TCR γδ. L'antigene CD45 è utilizzato nella strategia di gating in un dot plot contro il parametro fisico side scatter per identificare le tre popolazioni, linfocitaria, monocitaria e granulocitaria ed escludere globuli rossi e detriti. Su questo dot plot viene posto un gate sui linfociti e su questi vengono identificate le varie sottopopolazioni. I linfociti T sono caratterizzati dall'espressione dell'antigene di linea CD3. Le cellule CD3⁺CD4⁺ sono i linfociti T helper mentre cellule CD3⁺CD8⁺ sono i linfociti T citotossici. Gli antigeni CD45RA e CD62L servono per identificare i linfociti T naive e memory; in particolare, i linfociti T naive sono cellule CD45RA⁺CD62L⁺, mentre le cellule T memory sono cellule CD45RA⁻CD62L^{+/-} (Figura 23).

Le cellule natural killer (NK) sono identificate dall'espressione dell'antigene CD16/56 in assenza dell'antigene CD3, mentre le cellule NKT sono caratterizzate dalla coespressione degli antigeni CD3 e CD16/56.

I linfociti B sono identificati mediante l'antigene CD19.

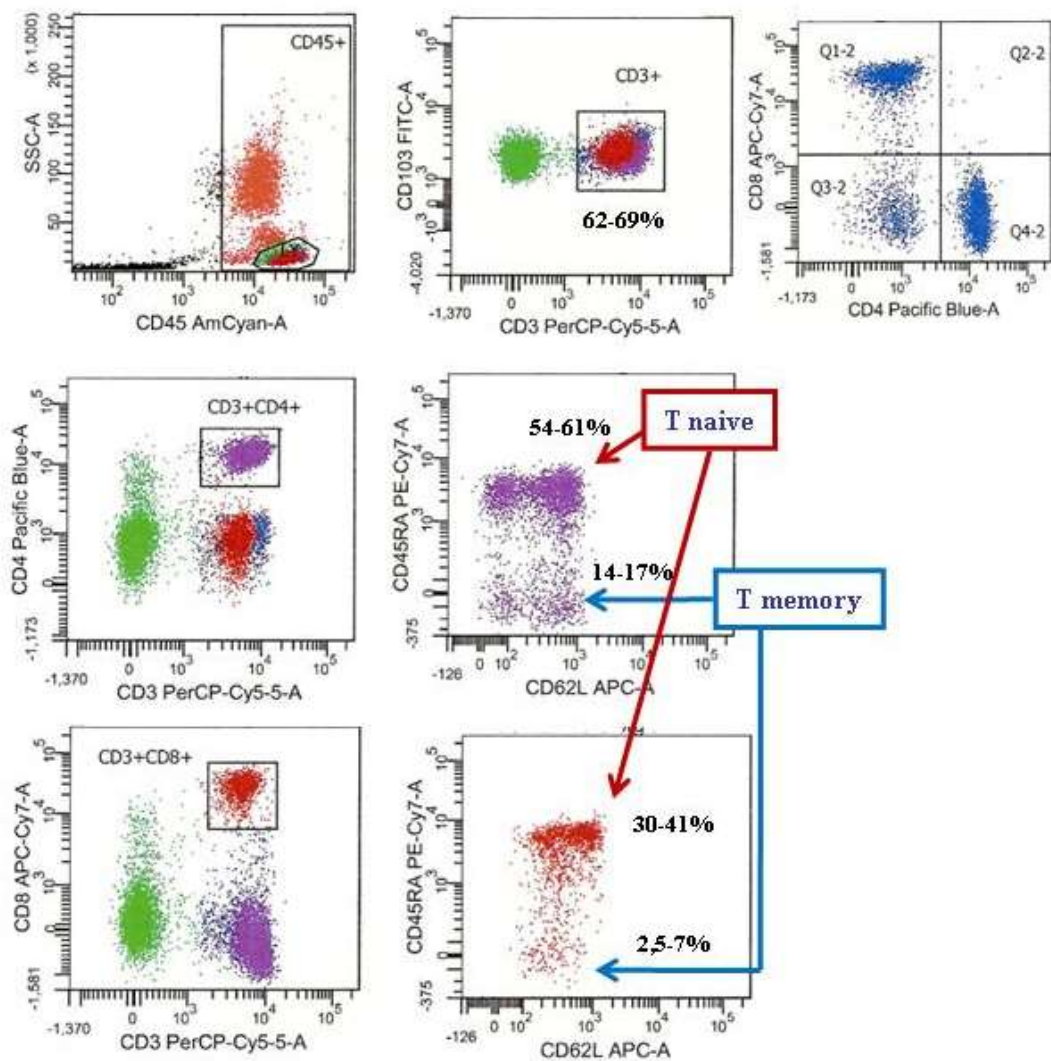


Figura 23. Strategia di gating utilizzata per la determinazione delle sottopopolazioni di linfociti T, CD4+ o CD8+, con fenotipo naive e memory.

2.10 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). I risultati sono espressi come medie \pm deviazioni standard (SD). Per valutare la significatività nel confronto tra i vari gruppi, è utilizzato il test di Student a due code (appaiato o non appaiato a seconda dei gruppi oggetto del confronto) se i valori seguono una distribuzione gaussiana. Nei casi di distribuzione non normale sono utilizzati il test di Mann-Whitney per campioni non appaiati ed il test di Wilcoxon per campioni appaiati. I valori sono considerati significativi per $P < 0,05$.

Capitolo 3

Risultati

3.1 CELLULE DENDRITICHE CIRCOLANTI

Come mostrato in Figura 24, il numero assoluto delle DC circolanti nei pazienti è significativamente ridotto rispetto ai controlli sani ($27,03 \pm 10,65/\mu\text{L}$ verso $42,03 \pm 13,20/\mu\text{L}$, rispettivamente; $P = 0,0054$). Tale riduzione è riconducibile ad entrambi i subset di DC, mieloidi e plasmacitoidi. Infatti le mDC e le pDC dei pazienti sono rispettivamente $16,01 \pm 7,58/\mu\text{L}$ e $11,1 \pm 6,62/\mu\text{L}$ ($24,58 \pm 7,73/\mu\text{L}$ e $18,61 \pm 10,16/\mu\text{L}$ nei controlli; $P = 0,013$ e $P = 0,038$). Analogamente, la percentuale (calcolata rispetto alle cellule mononucleate) di DC totali e di mDC è significativamente ridotta nei pazienti rispetto ai controlli ($0,86 \pm 0,26\%$ verso $1,25 \pm 0,48\%$ e mDC: $0,51 \pm 0,2\%$ verso $0,75 \pm 0,31\%$; rispettivamente $P = 0,021$ e $P = 0,034$), mentre la significatività non si riscontra quando l'analisi è effettuata sul subset plasmacitoide (pDC: $0,35 \pm 0,16\%$ verso $0,50 \pm 0,26\%$).

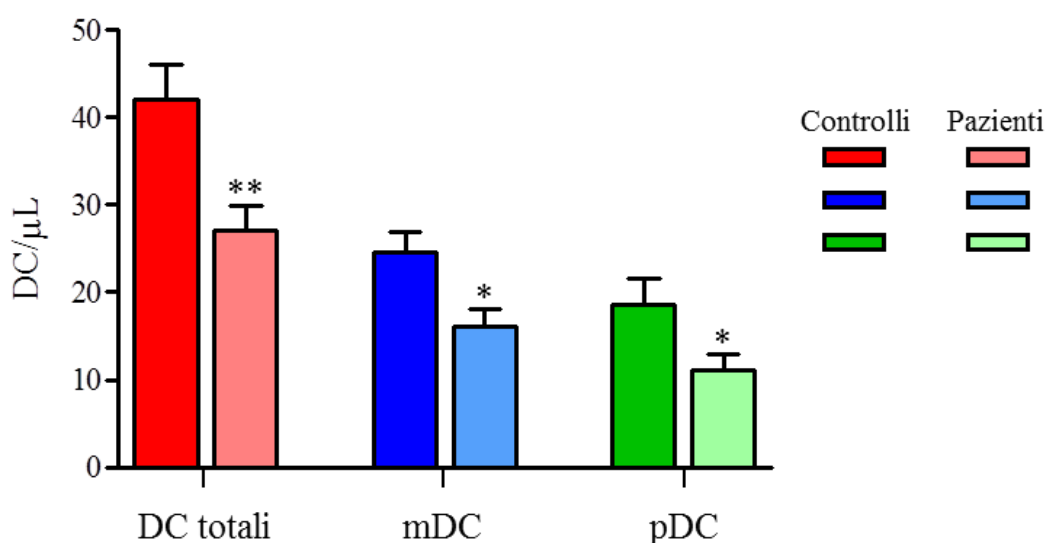


Figura 24. DC circolanti nei pazienti rispetto ai soggetti sani.

*Le colorazioni intense rappresentano i controlli, i toni più chiari rappresentano i pazienti. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$*

In Figura 25 sono riportati i valori assoluti delle DC circolanti di ogni singolo paziente rispetto alla media \pm SD dei controlli sani.

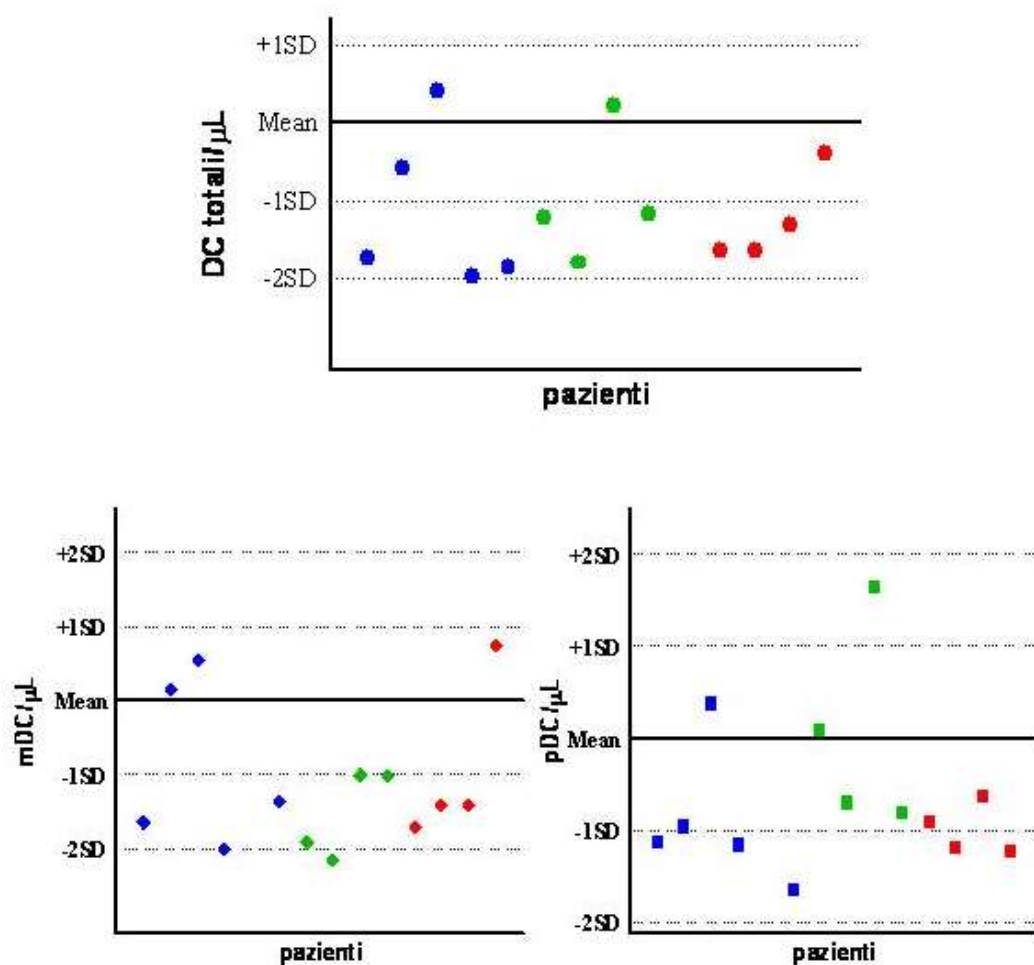


Figura 25. Distribuzione delle DC circolanti nei singoli pazienti rispetto ai controlli.

a), b) e c) mostrano rispettivamente, i valori assoluti delle DC circolanti totali, delle pDC e delle mDC circolanti dei singoli pazienti. Nel grafico sono riportate la media (linea continua) e le deviazioni standard (SD; linee tratteggiate) calcolate nel gruppo controllo. In blu sono rappresentati i pazienti con ipoparatiroidismo, in verde quelli con livelli di 25(OH)D3 \geq 20 ng/ml ed in rosso quelli con livelli di 25(OH)D3 < 20 ng/ml.

Nove pazienti presentano livelli totali di DC al di sotto di una SD.

Relativamente alle DC mieloidi la maggior parte dei pazienti (n=10) ha valori inferiori alla media e 8 di essi inferiori ad una SD. Solo un paziente presenta mDC inferiori a due SD. Quest'ultimo paziente aveva sviluppato due anni prima un tumore alla tiroide con metastasi polmonare.

Analogamente, la maggior parte dei pazienti (n = 10) ha valori di pDC inferiori alla media dei controlli e 5 presentano valori inferiori ad una SD. Solo tre pazienti hanno valori di pDC superiori alla media e uno di questi superiore ad una SD.

Il numero assoluto e il valore percentuale delle DC circolanti di ogni singolo paziente sono riportati nella Tabella 8.

Tabella 8. Valori assoluti e percentuali delle DC.

Pazienti	DCtot/ μ l	mDC/ μ l	mDC% ^A	pDC/ μ l	pDC% ^A
1	20,34	13,45	0,44	6,89	0,23
2	24,62	13,46	0,38	11,16	0,31
3	36,93	30,35	0,52	6,58	0,11
4	20,26	16,68	0,81	9,79	0,48
5	34,40	25,76	0,83	8,64	0,28
6	47,63	28,87	0,32	18,76	0,21
7	15,89	8,78	0,54	7,11	0,43
8	19,02	11,62	0,54	7,40	0,34
9	17,40	13,94	0,73	3,43	0,18
10	26,05	9,53	0,15	16,52	0,26
11	18,30	7,72	0,41	10,58	0,57
12	45,08	16,70	0,37	28,38	0,62
13	26,47	16,68	0,81	9,79	0,48
Media \pm SD	27,11 \pm 10,63	16,43 \pm 7,44	0,53 \pm 0,21	11,16 \pm 6,60	0,35 \pm 0,16
Media \pm SD ^C	42,05 \pm 13,18	24,58 \pm 7,83	0,89 \pm 0,32	18,63 \pm 10,14	0,50 \pm 0,26

^A: la % è calcolata rispetto alle cellule mononucleate

^C: relativa al gruppo controllo (n=12)

3.1.1 Espressione dell'antigene CD85K sulle cellule dendritiche

Il protocollo di studio ha incluso la valutazione sulle DC dei livelli di espressione dell'antigene CD85K poiché questo antigene è down-regolato in seguito a processi di attivazione ed up-regolato nelle DC tollerogeniche che inducono la formazione di cellule Treg [138].

Il CD85K è maggiormente espresso dal subset plasmacitoide delle DC rispetto al subset mieloide, sia nei controlli che nei pazienti.

I pazienti mostrano inoltre una maggiore espressione del CD85K (MFI) rispetto ai controlli sani, con differenze significative nel subset mieloide (mDC: $95,4 \pm 29,9$ verso $63,7 \pm 15,5$; $P = 0,0049$. pDC: $123,9 \pm 58,6$ verso $87,6 \pm 30,3$; $P > 0,05$), come mostrato in Figura 26.

L'analisi della distribuzione dell'espressione del CD85K nei singoli pazienti rispetto ai controlli sani mostra che tre pazienti presentano una sovraespressione dell'antigene (maggiore di 2 SD) in entrambi i subset delle DC. E' rilevante notare che uno dei tre pazienti ha sviluppato patologia autoimmune (Figura 26).

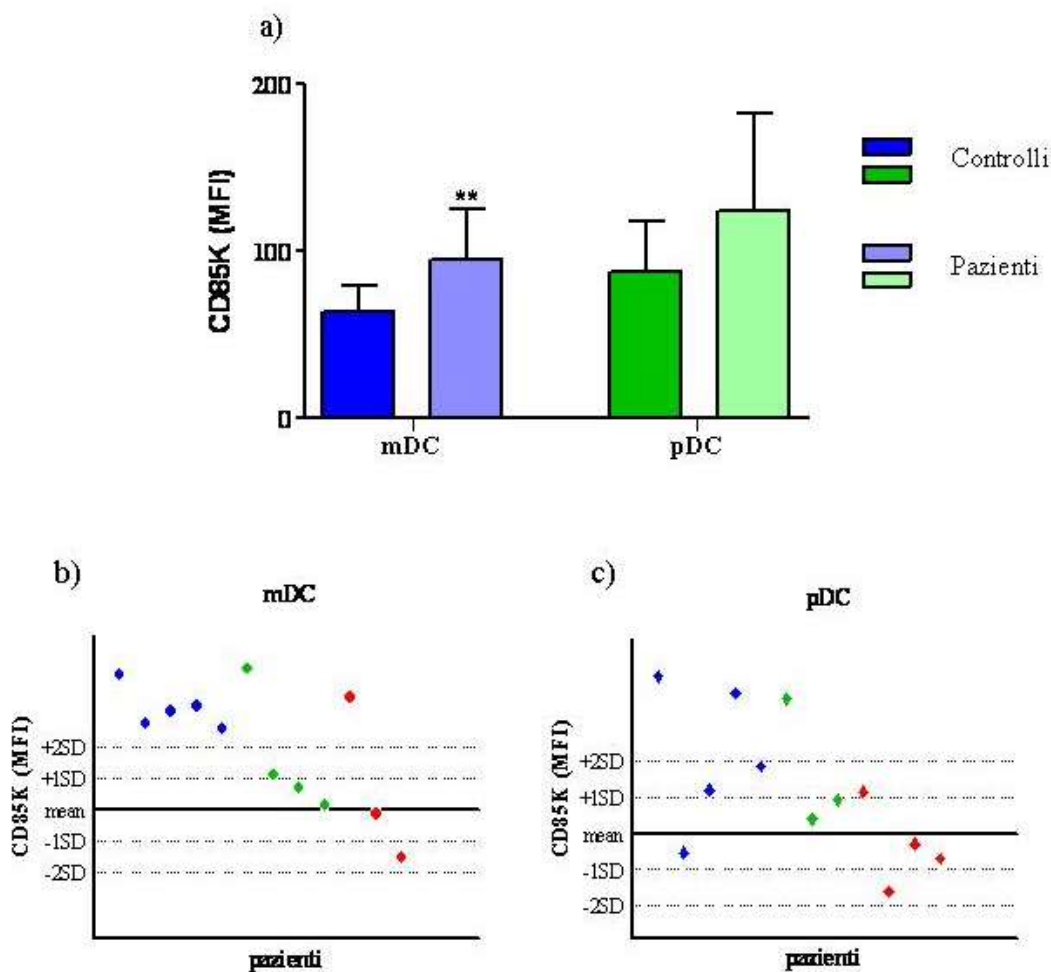


Figura 26. Espressione dell'antigene CD85K sulle cellule dendritiche.

a) espressione del CD85K sulle mDC e sulle pDC nei pazienti e nei controlli; b) e c) valori di espressione del CD85K rispettivamente sulle mDC e sulle pDC circolanti dei singoli pazienti. Nel grafico sono riportate la media (linea continua) e le deviazioni standard (SD; linee tratteggiate) calcolate sul gruppo di controllo. In blu sono rappresentati i pazienti con ipoparatiroidismo, in verde quelli con livelli di 25(OH)D3 ≥ 20 ng/ml ed in blu quelli con livelli di 25(OH)D3 < 20 ng/ml

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

3.1.2 Cellule dendritiche circolanti e 25(OH)D₃

Un'ulteriore analisi è stata condotta su pazienti suddivisi in base allo stato vitaminico D e alla presenza di ipoparatiroidismo. Sono stati identificati tre gruppi: pazienti con livelli di 25(OH)D₃ ≥ 20,00 ng/ml (gruppo A, n = 4), pazienti con livelli di 25(OH)D₃ < 20 ng/ml (gruppo B, n = 4) e pazienti con ipoparatiroidismo (gruppo C, n = 5). I livelli di 25(OH)D₃ nei gruppi A e B erano rispettivamente: 27,67 ± 7,45 ng/ml e 13,86 ± 3,34 ng/ml (*P* = 0,015). La determinazione dei livelli di 25(OH)D₃ non era rilevante nel gruppo C dei pazienti, in quanto, poiché trattati da anni con vitamina D e calcio, presentavano conseguentemente valori di 25(OH)D₃ > 20 ng/ml.

Anche il gruppo controllo è stato suddiviso in due sottogruppi sulla base dei livelli di 25(OH)D₃: individui sani e con livelli di 25(OH)D₃ ≥ 20,00 ng/ml (gruppo 1, n = 6) e individui sani ma con livelli di 25(OH)D₃ < 20,00 ng/ml (gruppo 2, n = 6); i livelli di 25(OH)D₃ tra i due gruppi differivano significativamente (25,3 ± 5,2 ng/ml e 14,9 ± 4,2 ng/ml, rispettivamente; *P* = 0,0035).

Le DC circolanti mostravano valori variabili nei tre gruppi di pazienti e comunque inferiori rispetto ai controlli (Figura 27); in particolare, i pazienti con livelli di 25(OH)D₃ nel range di normalità presentavano una riduzione significativa delle mDC rispetto ai controlli (12,66 ± 4,7 verso 23,93 ± 4,5; *P* = 0,008) mentre i pazienti con ipoparatiroidismo mostravano una riduzione significativa delle pDC rispetto ai controlli (9,07 ± 5,8 verso 26,26 ± 9,22; *P* = 0,032).

E' interessante notare che nel gruppo controllo, i soggetti sani caratterizzati da livelli di vitamina D inferiori al range di normalità, presentano una riduzione significativa delle pDC rispetto ai soggetti sani con livelli di 25(OH)D₃ normali (14,22 ± 7,1 verso 26,26 ± 9,22; *P* = 0,03) (Figura 27).

Il numero assoluto delle pDC non correlava con i livelli di 25(OH)D₃ nel gruppo dei soggetti sani utilizzati come controllo ai pazienti (test di correlazione di Pearson); tuttavia, un ampliamento del gruppo controllo fino a 19 soggetti (età compresa tra 1 e 33 anni), ha permesso di evidenziare una correlazione significativa (*r* = 0,47; *P* =

0,043). Nessuna correlazione è invece riscontrata tra il numero assoluto delle mDC e i livelli di 25(OH)D₃.

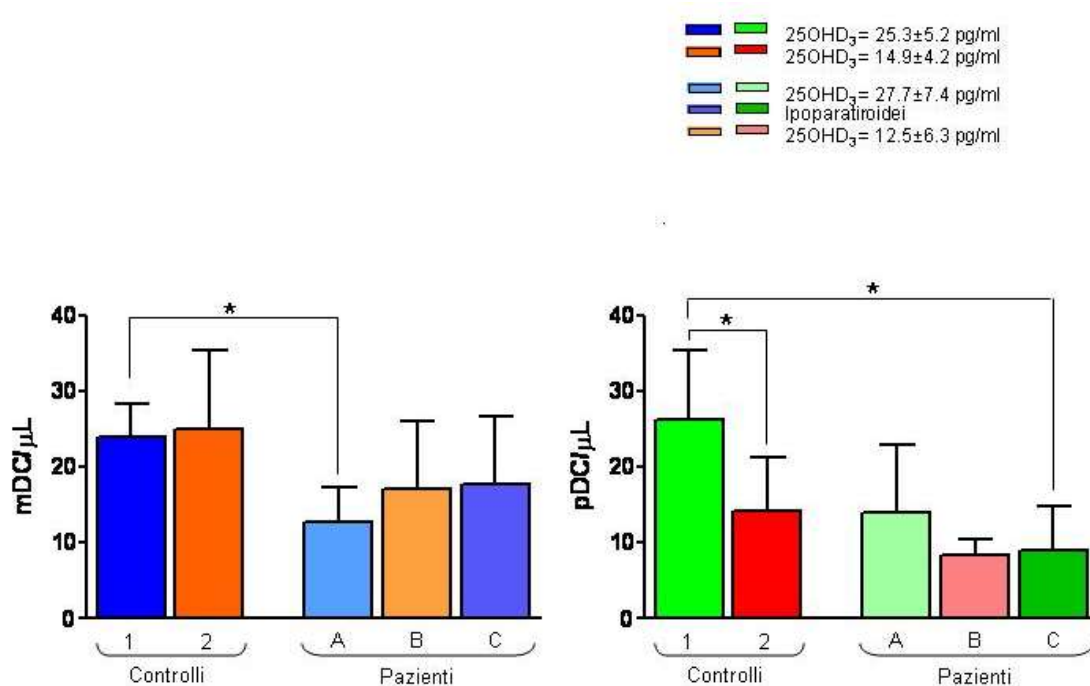


Figura 27. Livelli sierici di 25(OH)D₃ e numero assoluto di DC circolanti.

Le mDC a) e le pDC b) sono state misurate nei controlli e nei pazienti suddivisi in base allo stato vitaminico.

Nel gruppo dei controlli 1 e 2 indicano rispettivamente i sottogruppi di individui con livelli di 25(OH)D₃ ≥ 20 ng/ml e di 25(OH)D₃ < 20 ng/ml. Nel gruppo dei pazienti A, B, C indicano rispettivamente i sottogruppi di soggetti con livelli di 25(OH)D₃ ≥ 20 ng/ml, con livelli di 25(OH)D₃ < 20 ng/ml, con ipoparatiroidismo. *p<0.05

L'espressione dell'antigene CD85K è mostrata in Figura 28.

L'analisi del gruppo controllo suddiviso in due sottogruppi in base allo stato vitaminico, mostrava che livelli più bassi di espressione del CD85K, sebbene senza differenza significativa, si riscontravano nel gruppo con livelli di 25(OH)D₃ < 20 ng/ml.

La stessa analisi condotta nei pazienti suddivisi in gruppi sulla base dello stato vitaminico e della presenza di ipoparatiroidismo, mostrava che il maggior livello di

espressione del CD85K, sia sulle mDC che sulle pDC, era presente nel gruppo dei pazienti con ipoparatiroidismo e mostrava differenze significative rispetto ai controlli con livelli di $25(OH)D_3 \geq 20$ ng/ml nel subset mieloido (per il subset mieloido e plasmacitoide, rispettivamente: $113,6 \pm 10,4$ verso $66,6 \pm 22,1$; $P = 0,0037$ e $171,3 \pm 49,4$ verso $91,7 \pm 44,8$; $P = 0,06$). Nella Figura 26 (b e c) sono evidenti i livelli di espressione dell'antigene CD85K nei singoli pazienti appartenenti ai diversi gruppi.

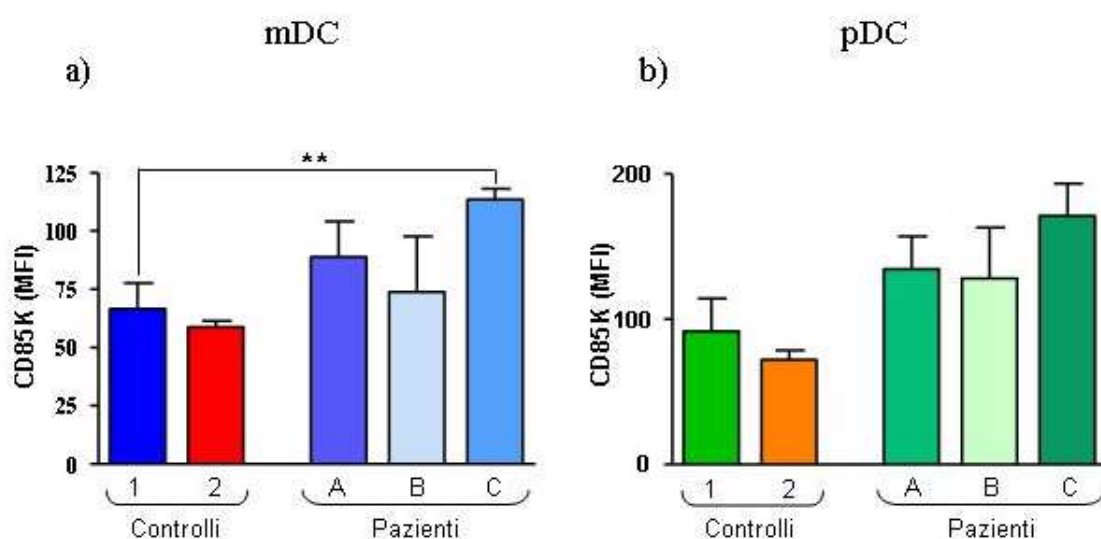


Figura 28. Espressione dell'antigene CD85K sulle cellule dendritiche in base allo stato vitaminico.

a) e b) espressione valutata rispettivamente sulle mDC e sulle pDC.

*Nel gruppo dei controlli 1 e 2 indicano rispettivamente i sottogruppi di individui con livelli di $25(OH)D_3 \geq 20$ ng/ml e di $25(OH)D_3 < 20$ ng/ml. Nel gruppo dei pazienti A, B, C indicano rispettivamente i sottogruppi di soggetti con livelli di $25(OH)D_3 \geq 20$ ng/ml, con livelli di $25(OH)D_3 < 20$ ng/ml, con ipoparatiroidismo. ** $p < 0.01$*

3.2 SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE

I pazienti hanno una percentuale di linfociti T ($CD3^+$) significativamente inferiore rispetto ai controlli ($55,1 \pm 11,5$ verso $72,6 \pm 3,0\%$; $P = 0,001$). Una riduzione significativa è evidente anche nel subset dei linfociti T helper ($CD3^+CD4^+$: $31,6 \pm 7,3$ verso $42,9 \pm 6,5\%$; $P = 0,003$), ma non nel subset dei linfociti T citotossici ($CD3^+CD8^+$). Al contrario, è presente un incremento significativo delle cellule natural killer ($CD16^+CD56^+$: $19,2 \pm 8,4$ verso $6,7 \pm 3,1$; $P = 0,0014$). La percentuale dei linfociti T con TCR $\gamma\delta$ è lievemente incrementata nei pazienti rispetto ai controlli, anche se non in modo significativo ($10,6 \pm 5,3$ verso $7,2 \pm 3,0$). Inoltre, valori sovrapponibili ai controlli si osservano relativamente ai linfociti B ($CD19^+$) e alle cellule NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$). I dati del fenotipo dei pazienti sono mostrati in Figura 29, Figura 30 e Tabella 9.

Tabella 9. Sottopopolazioni linfocitarie nei singoli pazienti

Paziente	CD3+	CD3+ CD4+	CD3+CD8+	CD4-CD8-	CD19+	NK	NKT	TCR $\gamma\delta$
1	44.80	26.60	14.90	2.80	17.70	32.70	3.40	8,80
2	59.60	28.40	21.90	10.90	20.70	16.30	2.30	11.50
3	44.80	24.40	12.80	11.00	14.20	20.00	3.80	16.50
4	52.10	32.20	11.10	nd	23.50	19.20	0.58	13.80
5	59.40	38.40	18.90	2.28	16.00	21.40	0.84	2.50
6	59.40	38.40	17.40	7.40	13.20	23.30	nd	7.00
7	67.30	43.40	21.80	2.40	14.80	15.70	nd	nd
8	60.70	30.50	19.40	17.20	20.40	16.00	0.20	17.20
9	60.20	29.40	15.00	20.10	29.30	8.30	33	18.60
10	42.90	27.40	11.90	5.50	25.10	15.70	nd	5.40
11	33.20	16.90	12.50	nd	28.00	36.10	nd	9.40
12	76.70	40.10	31.30	2.20	18.00	5.40	2,09	4.00
13	55.40	34.20	nd	nd	20.40	19.10	0.36	12.10
Media	55.12	31.56	17.40	8.20	20.10	19.17	5.17	10.57
SD	11.50	7.30	5.80	6.50	5.18	8.38	10.52	5.30

*I valori riportati in tabella sono calcolati come percentuale dei linfociti totali. I linfociti T con TCR $\gamma\delta$ sono calcolati come percentuale dei linfociti T $CD3^+$.
nd: valore non determinato*

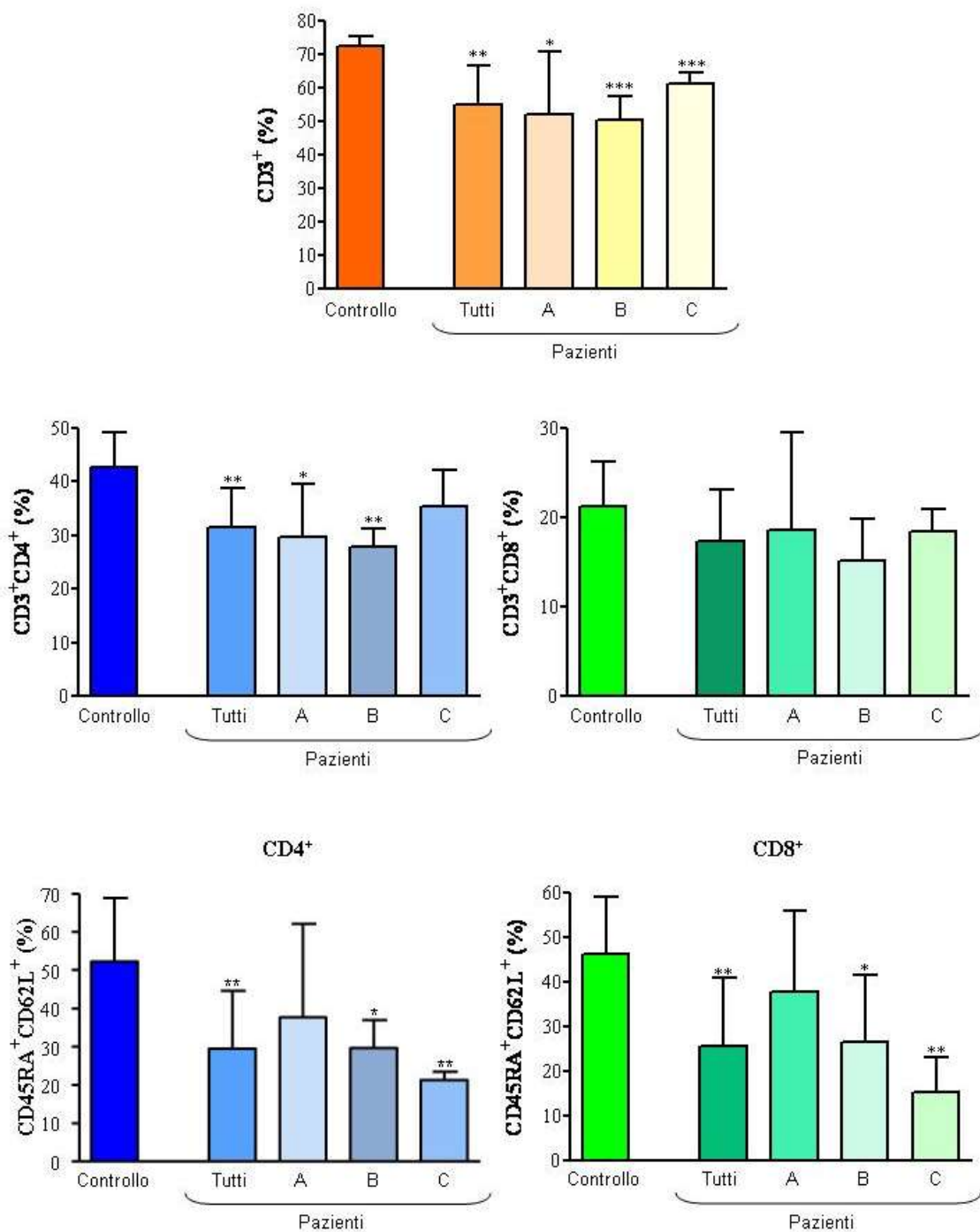


Figura 29. Sottopopolazioni linfocitarie nei pazienti rispetto ai soggetti sani.

Nel gruppo dei pazienti A, B, C indicano rispettivamente i sottogruppi di soggetti con livelli di $25(OH)D_3 \geq 20$ ng/ml, con livelli di $25(OH)D_3 < 20$ ng/ml, con ipoparatiroidismo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

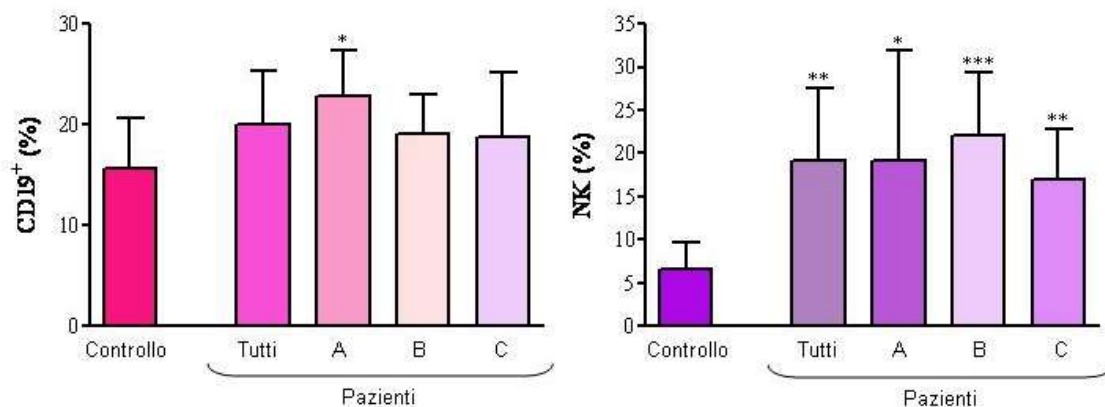


Figura 30. Linfociti B e cellule NK nei pazienti rispetto ai soggetti sani.

Nel gruppo dei pazienti A, B, C indicano rispettivamente i sottogruppi di soggetti con livelli di $25(OH)D_3 \geq 20$ ng/ml, con livelli di $25(OH)D_3 < 20$ ng/ml, con ipoparatiroidismo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

I linfociti T naive ($CD45RA^+CD62L^+$), sia $CD4^+$ che $CD8^+$, sono significativamente ridotti nei pazienti rispetto ai controlli. Infatti, le cellule naive dei pazienti e dei controlli sono rispettivamente, nel subset $CD4^+$: $29,5 \pm 15,1\%$ e $52,28 \pm 16,6\%$ ($P = 0,003$) e nel subset $CD8^+$: $25,6 \pm 15,5\%$ e $46,25 \pm 13\%$ ($P = 0,003$) (Figura 29).

L'analisi condotta suddividendo i pazienti in base ai livelli di $25(OH)D_3$ ed alla presenza di ipoparatiroidismo, ha evidenziato che tutti e tre i gruppi di pazienti mostrano una riduzione significativa dei linfociti T $CD3^+$ e un incremento significativo delle cellule NK rispetto ai controlli (Figura 21). Inoltre:

- il gruppo di pazienti con bassi livelli di $25(OH)D_3$ presenta la più elevata riduzione, rispetto ai controlli, sia dei linfociti T totali $CD3^+$ ($50,3 \pm 7,1\%$ verso $72,6 \pm 2,3$; $P < 0,0001$) che del subset $CD3^+CD4^+$ ($27,9 \pm 3,3\%$ verso $42,9 \pm 6,5$; $P = 0,0022$). Questo gruppo di pazienti mostra inoltre un elevato numero di cellule NK ($22,1 \pm 7,3\%$ verso $6,7 \pm 3,1$; $P = 0,0007$).

- Il gruppo di pazienti con livelli di vitamina D nel range di normalità presenta linfociti B (CD19⁺) significativamente superiori rispetto ai controlli ($22,9 \pm 4,5$ verso $15,7 \pm 5,0$; $P = 0,04$). A differenza degli altri due gruppi, in questi pazienti i linfociti T, sia CD4⁺ che CD8⁺, non differiscono significativamente dai controlli ($37,7 \pm 24,5$ verso $52,3 \pm 16,6$ e $34,6 \pm 22$ verso $46,3 \pm 13,0$).
- Nel gruppo dei pazienti con ipoparatiroidismo non c'è significatività nella riduzione dei linfociti T CD3+CD4⁺ rispetto ai controlli ($35,4 \pm 6,7$ verso $42,9 \pm 6,5$); tuttavia, è in questo gruppo che è possibile evidenziare la maggiore riduzione dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ naive, ($21,3 \pm 2,1$ verso $52,3 \pm 16,6$ e $15,4 \pm 7,9$; $P = 0,002$ e $P = 0,0075$). L'andamento dei linfociti T naive nei singoli pazienti è mostrato in Figura 31.

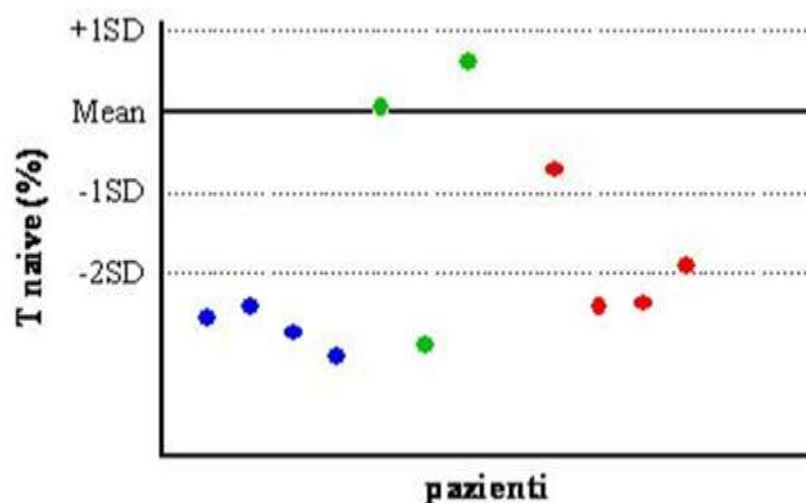


Figura 31. Linfociti T nei pazienti

Relativamente ai linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ con fenotipo memory (cellule effettrici e della memoria centrale), i pazienti mostrano valori percentuali completamente sovrapponibili

ai controlli sani (rispettivamente $43,4 \pm 8,6\%$ verso $44,0 \pm 21,4\%$ e $35,3 \pm 11,3\%$ verso $35,4 \pm 16,2\%$). Analogamente non ci sono differenze significative tra la percentuale di cellule $CD4^+$ e $CD8^+$ memory dei singoli gruppi di pazienti (A, B, C) e i controlli.

3.3 CORRELAZIONE TRA DC E CELLULE DEL SISTEMA IMMUNE

L'analisi della correlazione tra i valori percentuali delle DC (totali, mieloidi, plasmacitoidi) e quelli delle varie sottopopolazioni linfocitarie (linfociti T, T citotossici e T helper, cellule NK) non ha mostrato alcuna significatività. Similmente, nessuna correlazione è presente tra i linfociti con fenotipo memory e le DC, mentre una moderata correlazione inversa è individuabile tra i linfociti T $CD4^+$ con fenotipo naive e il sottotipo mieloide delle cellule dendritiche ($R = -0,6$; $P = 0,045$).

3.4 SUPPLEMENTAZIONE CON VITAMINA D DEI PAZIENTI CON LIVELLI DI 25(OH)D₃ INFERIORI A 20 NG/ML.

Tre pazienti con livelli di 25(OH)D₃ inferiori alla norma (11,9 ng/ml; 13,6 ng/ml; 11,3 ng/ml) sono stati supplementati con vitamina D. Le DC e gli altri parametri immunologici sono valutati prima e durante la supplementazione. La stessa valutazione immunologica è stata inoltre effettuata in un paziente che ha mostrato un naturale incremento dei livelli sierici di 25(OH)D₃ in occasione di due distinti prelievi, effettuati a distanza di un anno, nei quali i livelli di vitamina D erano rispettivamente 18,65 ng/ml e 20,5 ng/ml. Al primo prelievo, prima della supplementazione con vitamina D, le cellule dendritiche totali erano inferiori alla media dei controlli in tutti e quattro i pazienti; in particolare, in tre pazienti erano inferiori di due deviazioni standard e in un paziente di una deviazione standard. Al secondo prelievo (livelli di 25(OH)D₃ > 20 ng/ml) le DC totali incrementano in tutti i pazienti ad eccezione di uno. L'unico paziente che mostra una riduzione delle DC totali dopo la supplementazione con

Vitamina D, ha sospeso il trattamento dopo il primo mese (a causa di una incomprensione) ma mostra un aumento del numero assoluto di DC totali nel prelievo successivo all'interruzione. Analogamente, le mDC, inferiori a due deviazioni standard in tre pazienti al primo prelievo, incrementano in seguito all'aumento dei livelli di 25(OH)D₃ nel sangue. Anche le pDC mostrano, in tre pazienti, un incremento legato all'aumento dei livelli sierici di 25(OH)D₃. La Figura 32 schematizza l'andamento delle DC nei pazienti supplementati con vitamina D.

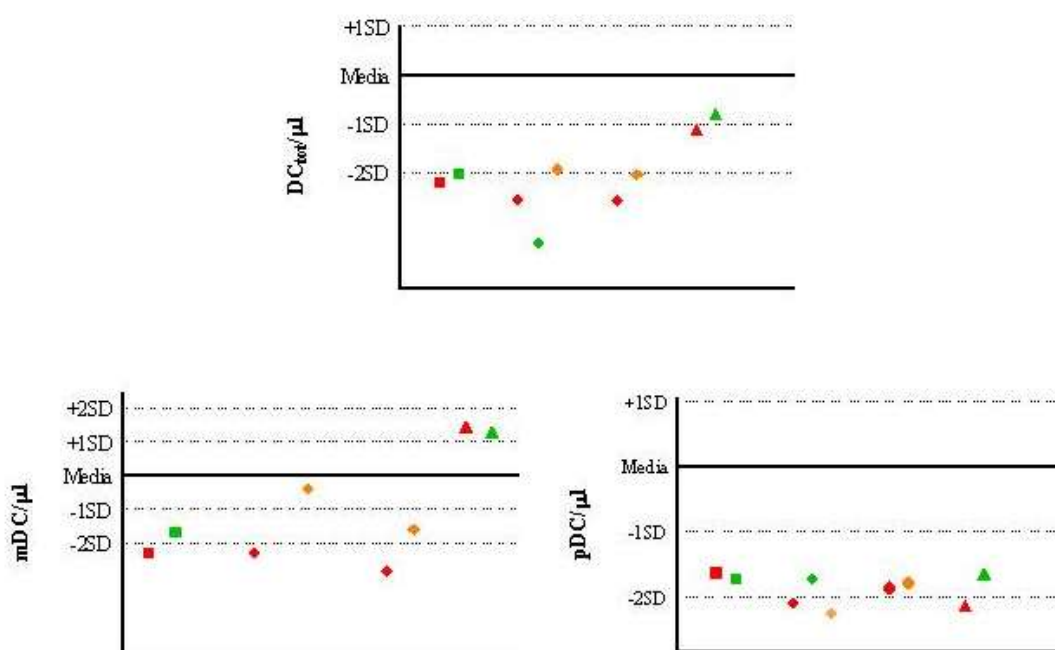


Figura 32. Andamento della concentrazione plasmatica della 25(OH)D₃ nel corso della supplementazione.

Al contrario delle DC i linfociti T e le relative sottopopolazioni non variano sostanzialmente in seguito a supplementazione con vitamina D. Una lieve riduzione è visibile solo per le cellule NK che dal 22% passano al 20,7% dopo un mese di supplementazione.

3.5 GENERAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE DA MONOCITI

La capacità dei monociti a differenziare in cellule dendritiche è stata valutata mediante colture in vitro in cinque pazienti. Un solo paziente su cinque mostra una ridotta capacità generativa come dimostrato dall'espressione dell'antigene CD14. Questo antigene è un marcatore tipico dei monociti, viene perso durante il processo differenziativo da monociti a DC ed è assente sulle DC. In questo paziente, il CD14 è espresso dal 32,5% delle cellule. In aggiunta, si osserva anche un difetto di maturazione; infatti, l'antigene CD83, espresso dalle cellule dendritiche mature, in questo paziente è espresso solo dal 18,5% delle cellule. Anche le molecole co-stimolatorie e l'antigene HLA-DR sono ridotti rispetto ai controlli ed agli altri pazienti con SDG. Questo risultato non corrisponde ai dati relativi alle DC circolanti, che per il paziente in questione rientrano nel range di normalità.

L'endocitosi di FITC-destrano mostra una lieve riduzione rispetto ai controlli in tutti i pazienti analizzati (n = 4).

Capitolo 4

Discussione

Nei pazienti con sindrome di DiGeorge (SDG) le manifestazioni cliniche su base immunologica sono comuni e non si limitano a patologia infettiva; molti pazienti infatti possono sviluppare patologie severe, complicanze autoimmuni e/o tumori. Tuttavia la variabilità delle alterazioni immunologiche in questi pazienti non permette di costruire dei protocolli comportamentali in termini di accertamento diagnostico del difetto immunologico e di eventuali terapie.

La letteratura non riporta studi dettagliati sullo stato immune di questi pazienti, focalizzando l'attenzione sul numero e la funzione dei linfociti T.

L'immunodeficienza conseguente all'ipoplasia timica è studiata da almeno 50 anni ed è conosciuta essere estremamente variabile. Lo spettro dell'immunodeficienza varia da assenza delle cellule T nell'aplasia timica, a numeri normali delle stesse [72, 139]. La funzione cellulare T è per contro tipicamente preservata, sebbene i saggi di proliferazione ai mitogeni standard siano generalmente diminuiti quando il numero di cellule T è molto basso [72]. Nella SDG sono state occasionalmente descritte deficienza di IgA, ipogammaglobulinemia e difetti funzionali della produzione anticorpale che sono ritenuti essere secondari al difetto delle cellule T [66,139].

I nostri risultati non si discostano da quanto riportato in letteratura: i pazienti da noi studiati hanno mostrato una riduzione significativa di linfociti T CD3⁺ rispetto al gruppo controllo. Tale riduzione è attribuibile al subset dei linfociti T helper (CD3⁺CD4⁺) mentre il subset dei linfociti T citotossici (CD3⁺CD8⁺) non mostra una riduzione significativa. Perez E. e collaboratori hanno mostrato una riduzione del numero di cellule T [63], non correlabile al decorso clinico, indicando aggiuntivamente che il numero di cellule T non può essere predittivo di infezione in pazienti con riduzione T cellulare da lieve a moderata. Altri autori [140, 73] hanno mostrato che la compromissione dell'immunità cellulare è dipendente dall'età, con il deficit maggiore osservato nel periodo neonatale. Inoltre, la fisiologica riduzione dei linfociti T, che si verifica con l'avanzare dell'età, è più lenta nei pazienti rispetto ai sani; in tal modo, nei pazienti si osserva un relativo incremento del numero di cellule T con l'età. McLean-Tooke e collaboratori hanno dimostrato che, all'interno delle cellule T CD3⁺, la velocità di declino è più lenta nel subset CD4⁺ [141]. Tison e collaboratori suggeriscono

che elevati valori di cellule T CD4⁺ naive nei pazienti potrebbero indicare un ridotto rischio di malattia autoimmune [142].

Sebbene la SDG sia caratterizzata principalmente da una deficienza di produzione delle cellule T, le aberrazioni immunologiche sono molto più complesse [139].

Inoltre, poiché la maggior parte degli studi sono trasversali, ci sono ancora pochi dati sulla storia immunologica longitudinale dei pazienti.

Pertanto, questo lavoro si è posto come obiettivo un'indagine approfondita del sistema immunitario in un gruppo di 12 pazienti pediatriche con SDG parziale, ponendo particolare attenzione allo studio delle cellule dendritiche.

Il nostro studio dimostra una riduzione significativa dei linfociti T naive (CD45RA⁺CD62L⁺) all'interno di entrambi i subset linfocitari, sia CD4⁺ che CD8⁺. Per contro, nei pazienti si osserva un incremento significativo delle cellule NK a presumibile significato compensatorio. Valori sovrapponibili ai controlli sono invece riscontrati nelle popolazioni di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ con fenotipo memory (cellule effettrici e della memoria centrale), di linfociti B e di cellule NKT.

Le cellule dendritiche, sebbene rappresentino soltanto lo 0,1-1% delle cellule mononucleate del sangue, svolgono un ruolo chiave in quanto inducono, sostengono e regolano le risposte immunitarie. Le DC sono le cellule più potenti nell'indurre una risposta T-linfocitaria ed hanno la peculiare capacità di stimolare non solo cellule T-memoria ma soprattutto i linfociti T naive [143]. Questo ruolo fondamentale le ha rese bersaglio di ricerche intensive, non solo per chiarire la loro funzione, le vie di segnale e di attivazione ma anche per comprendere il loro ruolo in differenti malattie e la possibilità di manipolare la loro attività con intento terapeutico [144].

Le due principali sottopopolazioni di DC nel sangue periferico, le DC mieloidi (mDC) e le DC plasmacitoidi (pDC), sono caratterizzate da un diverso profilo citochinico e chemochinico. Esse sembrano esercitare effetti complementari sulle cellule T: infatti mentre le mDC sono efficienti APC, le pDC sono maggiormente legate alla tolleranza immunitaria. Sia l'enumerazione che la caratterizzazione funzionale di queste cellule sono importanti nel contesto di diverse malattie. Studi di enumerazione

hanno mostrato significativi cambiamenti nel numero delle DC nel sangue periferico in varie condizioni cliniche comprese le malattie autoimmuni, il cancro e l'invecchiamento [144-147, 138]. Tuttavia, il loro ruolo nella SDG non è ancora stato investigato.

Alla luce di queste considerazioni abbiamo voluto focalizzare la nostra attenzione sulla popolazione cellulare dendritica.

In questo studio mostriamo che i pazienti presentano una riduzione significativa del numero assoluto delle DC circolanti rispetto ai controlli sani; tale riduzione è riconducibile ad entrambi i subset di DC, mieloide e plasmacitoide. Analogamente, la percentuale (calcolata rispetto alle cellule mononucleate) di DC totali e di mDC è significativamente ridotta nei pazienti rispetto ai controlli, mentre la significatività non si riscontra quando l'analisi è effettuata sul subset plasmacitoide. In particolare, il paziente con maggiore riduzione delle mDC (inferiore a due SD rispetto alla media dei controlli) ha sviluppato patologia tumorale. Per quanto la nostra sia una singola osservazione in un piccolo gruppo di pazienti, numerosi autori hanno dimostrato, in diversi tipi di tumore, una riduzione delle DC (in particolare del subset mieloide); tale riduzione è osservabile in particolare negli stadi avanzati di malattia ed è considerata uno dei principali meccanismi di escape tumorale [149- 151].

La strategia di gating delle DC scelta nel nostro approccio sperimentale ci ha inoltre consentito di analizzare il livello di espressione dell'antigene CD85K su queste cellule. I pazienti mostrano una maggiore espressione del CD85K rispetto ai controlli sani, con differenze significative nel subset mieloide. L'analisi della distribuzione dell'espressione del CD85K nei singoli pazienti mostra, in tre pazienti, una sovraespressione dell'antigene (maggiore di 2 SD rispetto alla media dei controlli) su entrambi i subset di DC. E' rilevante notare che uno dei tre pazienti presenta patologia autoimmune. Questo dato potrebbe far pensare alla presenza in questi pazienti di DC tollerogeniche, in quanto l'antigene CD85K è up-regolato nelle DC tollerogeniche che inducono la formazione di cellule Treg [138, 152, 153]. Tuttavia solo un paziente su 3 ha sviluppato patologia autoimmune; sarà pertanto utile lo studio nel tempo degli altri due pazienti al fine di valutarne l'andamento clinico.

Dagli studi in vitro è emerso che un paziente presenta un deficit di generazione delle DC a partire da monociti, contrariamente ai valori delle mDC circolanti che rientrano invece nel range di normalità, suggerendo che la diversità dei risultati sia attribuibile alla diversità della procedura sperimentale effettuata rispettivamente in vitro piuttosto che in vivo.

Da più di 25 anni è noto che la vitamina D non agisce esclusivamente a livello del metabolismo fosfo-calcico. Negli ultimi anni i ricercatori hanno iniziato ad approcciarsi alla vitamina D in modo completamente diverso rispetto al passato, basandosi principalmente su due concetti chiave. Il primo deriva dalla crescente evidenza della diffusa distribuzione tissutale dell'enzima CYP27B1 che converte la vitamina D nella sua forma attiva, sostenendo in tal modo una più localizzata, intracrina o paracrina, funzione per la vitamina D al di fuori dallo scheletro. A differenza dell'enzima CYP27B1 renale, che regola la produzione dei livelli circolanti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la produzione della forma attiva della vitamina D nei siti extra-renali sembra non essere influenzata da regolatori ormonali, come l'ormone paratiroideo, ma sembra essere principalmente dipendente dalla disponibilità del substrato $25(\text{OH})\text{D}_3$. I livelli sierici di $25(\text{OH})\text{D}_3$ hanno fornito il secondo, e più controverso, concetto per la nostra nuova visione della vitamina D. Studi di associazione hanno messo in evidenza il potenziale legame tra lo stato vitaminico D e molte malattie umane comuni, ma non è ancora chiaro se questo sia causale o causato dalla compromissione della capacità di attivazione extrarenale e della capacità funzionale della vitamina D. In particolare, numerosi studi riportano una correlazione inversa tra i livelli di vitamina D e l'incidenza di alcune patologie come malattie infettive, malattie autoimmuni e neoplasie [154, 155]. Analogamente, non è chiaro se la concentrazione plasmatica di vitamina D considerata sufficiente e recentemente raccomandata dall'Institute of Medicine (IOM), sia valida oltre che per le azioni scheletriche anche per quelle non scheletriche della vitamina D [136, 156, 157]. L'IOM ha sottolineato la necessità di maggiori controlli per valutare l'impatto di un aumento dei livelli sierici della $25(\text{OH})\text{D}_3$ sugli effetti extra-scheletrici e sugli eventuali effetti avversi correlati. Molti di questi studi sono attualmente in corso ed includono, in particolare, quelli volti a valutare l'impatto immunomodulante della

supplementazione con vitamina D, sebbene anche gli effetti antitumorali siano importanti.

In considerazione dei riconosciuti effetti immunomodulanti, la determinazione della vitamina D è stata effettuata in un gruppo di soggetti sani e nella coorte dei pazienti con SDG. All'interno del gruppo di controllo sono stati identificati due sottogruppi in base alla concentrazione plasmatica di 25(OH)D₃, utilizzando il cut-off di 20 ng/ml. Anche i pazienti sono stati suddivisi in gruppi, sulla base dello stato vitaminico e della presenza di ipoparatiroidismo, al fine di valutare se fosse possibile identificare correlazioni tra livelli sierici di vitamina D e deficit immune.

Relativamente agli effetti sulle DC, alcuni studi hanno dimostrato che la 1,25(OH)₂D₃ ne inibisce la maturazione e la differenziazione, portando alla formazione di cellule coinvolte in meccanismi di tolleranza ed inibendo la formazione di cellule coinvolte in meccanismi di difesa [158].

Il nostro studio mostra che nel gruppo dei soggetti sani caratterizzati da livelli di vitamina D inferiori al range di normalità è presente una riduzione significativa delle pDC rispetto al gruppo dei soggetti sani con livelli di 25(OH)D₃ normali, mentre non sono evidenti differenze significative nel subset delle DC mieloidi. In considerazione del numero esiguo di soggetti sani utilizzati come controllo, non è stato possibile individuare alcuna correlazione tra il numero assoluto delle pDC ed i livelli di 25(OH)D₃; tuttavia, un ampliamento del gruppo controllo fino a 19 soggetti ha permesso di evidenziare una correlazione significativa. Nessuna correlazione è invece riscontrata tra il numero assoluto delle mDC e i livelli di 25(OH)D₃. Penna e collaboratori riportano che la vitamina D regola in modo preferenziale il sottotipo delle mDC, con conseguente soppressione dell'attivazione delle cellule T naive [159]. La differenza nei risultati ottenuti nel nostro studio, potrebbe essere attribuita alla diversa modalità di indagine, in vivo nel nostro studio, rispetto a quella in vitro della letteratura.

Relativamente ai pazienti, possiamo identificare differenze nelle varie componenti immuni a seconda dei livelli di 25(OH)D₃.

Nel gruppo dei pazienti con livelli di 25(OH)D₃ nel range di normalità è presente una riduzione significativa del numero assoluto delle mDC e un aumento significativo dei linfociti B rispetto ai controlli; inoltre, questi pazienti, contrariamente agli altri due

gruppi, hanno linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ non significativamente diversi dal gruppo di controllo.

Il gruppo di pazienti con bassi livelli di 25(OH)D₃ è caratterizzato dalla maggior riduzione sia dei linfociti T totali CD3⁺ che del subset dei linfociti CD3⁺CD4⁺ e dal più elevato numero di cellule NK.

Infine, il gruppo dei pazienti con ipoparatiroidismo mostra una riduzione significativa delle pDC e livelli di espressione del CD85K sulle mDC superiori a due deviazioni standard rispetto al valore medio calcolato nel gruppo controllo. E' interessante notare, inoltre che tutti i pazienti di questo gruppo presentano livelli molto bassi di linfociti T naive. Pertanto queste caratteristiche suggeriscono che i pazienti con ipoparatiroidismo (seppure in basso numero) potrebbero essere associati ad un più alto rischio di malattia autoimmune.

Herwadkar e collaboratori riportano che i pazienti con ipoparatiroidismo hanno maggiori probabilità di avere un deficit di cellule T clinicamente rilevante e bassi parametri di laboratorio della funzione cellulare T, con un più alto rischio di sviluppare candidosi, bronchioliti virali ed enterite [160].

Lo studio dei pazienti supplementati con vitamina D mostra allo stato attuale un incremento delle DC parallelo all'aumento dei livelli di 25(OH)D₃ nel sangue, mentre rimangono immutati gli altri parametri immuni. Tuttavia si tratta di dati preliminari che necessitano di una casistica più ampia e di un follow-up durante il periodo di supplementazione affinché si possa attribuire un ruolo immunomodulatore alla vitamina D.

In conclusione, nel gruppo dei soggetti normali lo stato vitaminico D sembra modulare il numero di DC circolanti e tale osservazione può almeno parzialmente essere applicata anche ai pazienti. L'osservazione dello stato clinico dei pazienti ha evidenziato che il paziente che presenta mDC inferiori a due deviazioni standard rispetto alla media dei controlli ha sviluppato una patologia tumorale e un paziente con elevata espressione dell'antigene CD85K in entrambi i subset, mieloidi e plasmacitoidi, ha sviluppato patologia autoimmune.

Mentre la letteratura attribuisce il deficit immune dei pazienti con SDG al solo comparto cellulo-mediato, il nostro studio evidenzia il contributo della immunità innata.

Un'estensione dello studio ad un gruppo più ampio di pazienti e il follow-up dei parametri immuni, potrebbe aiutare ad identificare un sottogruppo di pazienti con anomalie immunologiche complesse e quindi a più alto rischio di sviluppare malattie autoimmuni, infettive e tumorali. Il ristretto numero di pazienti trattati con vitamina D non ha permesso di stabilirne la potenzialità immunomodulante.

Capitolo 5

Bibliografia

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. e Pober J.S. Immunologia cellulare e molecolare. III Edizione 1998, Piccin, Padova.
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973.137:1142
3. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* 1974.139:380
4. Young MR, Wright MA, Vellody K, Lathers DM. Skewed differentiation of bone marrow CD34+ cells of tumor bearers from dendritic toward monocytic cells, and the redirection of differentiation toward dendritic cells by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Int J Immunopharmacol.* 1999. 21(10):675
5. Walsh KP, Mills KH. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* 2013. pii: S1471-4906(13)00117
6. Ralph M. Steinman & Jacques Banchereau. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007. 449, 419
7. Nestle FO, Nickoloff BJ. Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system. *Adv Exp Med Biol.* 1995. 378:111
8. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 1992. 360:258
9. Bruynzeel-Koomen C, van Wichen DF, Toonstra J, Berrens L, Bruynzeel PL. The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 1986. 278:199

10. Fokkens WJ, Broekhuis-Fluitsma DM, Rijntjes E, Vroom TM, Hoefsmit EC. Langerhans cells in nasal mucosa of patients with grass pollen allergy. *Immunobiology*. 1991. 182:135
11. Moller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwsen CG, Van Haarst JM, Prens EP, Mulder PG, Postma DS, Hoogsteden HC. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy*. 1996. 26:517
12. Fokkens WJ, Vroom TM, Rijntjes E, Mulder PG. CD-1 (T6), HLA-DRexpressing cells, presumably Langerhans cells, in nasal mucosa. *Allergy*. 1989.44:167
13. Soler P, Moreau A, Basset F, Hance AJ. Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/Langerhans cells. *Am Rev Respir Dis*. 1989.139:1112
14. Barrett AW, Cruchley AT, Williams DM. Oral mucosal Langerhans' cells. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996. 7:36
15. Pavli P, Hume DA, Van De Pol E, Doe WF. Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. *Immunology*. 1993. 78:132
16. Van Wilsem EJ, Van Hoogstraten IM, Breve J, Scheper RJ, Kraal G. Dendritic cells of the oral mucosa and the induction of oral tolerance. A local affair. *Immunology*. 1994. 83:128
17. Fokkens WJ, Vinke JG, De Jong SS, Bogaert DP, Kleinjan A, Eichhorn E. Differences in cellular infiltrates in the adenoid of allergic children compared with age-and gender-matched controls. *Clin Exp Allergy*. 1998. 84:281
18. Soler P, Tazi A, Basset F, Hance AJ. Pulmonary dendritic cells. *Rev Mal Respir*. 1991. 8:191

19. Balfour BM, Drexhage HA, Kamperdijk EW, Hoefsmit EC. Antigenpresenting cells, including Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells. *Ciba Found Symp.* 1981. 84:281
20. Havenith CE, Breedijk AJ, Betjes MG, Calame W, Beelen RH, Hoefsmit EC. T cell priming in situ by intratracheally instilled antigen-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993. 8:319
21. Sminia T, Wilders MM, Janse EM, Hoefsmit EC. Characterization of nonlymphoid cells in Peyer's patches of the rat. *Immunology.* 1983. 164:136
22. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000. 18:767
23. Ranieri E. Dall'autoimmunità al cancro: una questione di doppia identità *Giornale Italiano di Nefrologia.* 2005. Anno 22 n. 2:140
24. Cella M, Scheiddeger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 1996. 184:747
25. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G, The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J.Immunol.* 2005.174:727
26. Mazza, Dacarro, *Microorganismi e malattie. Microbiologia farmaceutica.* 2004. Pag. 131
27. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K., Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int.Immunol.* 2004. 16:915

28. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y J, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000. 18:767
29. Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol.* 2000. 165: 6762
30. Pulendran B, Tang H and Denning T L. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Current Opinion in Immunology.* 2008. 20:61
31. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995. 182:389
32. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Rev. Immunol.* 2002, 20,621–667.
33. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23, 975–1028.
34. Vegh Z, Mazumder A. Generation of tumor cell lysate-loaded dendritic cells preprogrammed for IL-12 production and augmented T cell response. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 67-79.
35. Lee AW, Truong T, Bickham K, et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine.* 2002; 20 Suppl 4:A8-A22.
36. Rouard H, Marquet J, Leon A, et al. IL-12 secreting dendritic cells are required for optimum activation of human secondary lymphoid tissue T cells. *J Immunother.* 2002. 2:324

37. Bromley, S.K., W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen and M.L. Dustin, The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. 19:375
38. Bakker TR, van der Merwe PA. Self-help in T cell recognition? *Nat Immunol.* 2002. 3(1):11
39. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM & Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005. 6: 1123
40. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA & Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005. 201:233
41. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q & Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005. 6:1133
42. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL & Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006. 441:235
43. Iwakura Y & Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006. 116:1218
44. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M & Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006. 203:2271
45. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S,

- Charrier K, Peschon JJ & Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 2001. 194:519
46. Dasgupta A, Saxena R. Regulatory T cells: a review. *Natl Med J India*. 2012. 25(6):341
47. Pession A., Verlicchi L., Immunodeficienze congenite e acquisite, L Mirabile, S Baroncini (eds). *Rianimazione in età pediatrica*, Springer-Verlag Italia, 2012. Pag. 91.
48. Ugazio A., *Le immunodeficienze primitive*, quaderno numero 3 AIP ONLUS
49. DiGeorge AM. Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: concurrence with congenital hypoparathyroidism. IV(1). White Plains, NY: March of Dimes-Birth Defects Foundation; 1968. 116:21.
50. Driscoll DA, Salvin J, Sellinger B et al. Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counseling and prenatal diagnosis. *J Med Genet*. 1993; 30:817
51. Larson RS, Butler MG. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of DiGeorge sequence and related diseases. *Diagn Mol Pathol*. 1995. 4(4):274
52. Lindsay, E. A., Vitelli, F., Su, H., Morishima, M., Huynh, T., Pramparo, T., Jurecic, V., Ogunrinu, G., Sutherland, H. F., Scambler, P. J. et al. *Tbx1* haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*. 2001.410:97
53. Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Ichida, F., Joo, K., Kimura, M., Imamura, S. et al. Role of *TBX1* in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*. 2003. 62:366

54. Cutrupi M.C., Gallizzi R., Ferrà V., Cuppari C., Briuglia S., Rigoli L., Salpietro Damiano C. La sindrome di DiGeorge: peculiarità cliniche e genetiche. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica*. 2008. 3:37
55. Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet*. 2000. 9:489
56. Baumer A, Riegel M, Schinzel A. Non-random asynchronous replication at 22q11.2 favours unequal meiotic crossovers leading to the human 22q11.2 deletion. *J Med Genet*. 2004. 41:413
57. Baldini, A. DiGeorge syndrome: the use of model organisms to dissect complex genetics. *Hum. Mol. Genet*. 2002. 11:2363
58. Kobrynski LJ and Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*. 2007. 370:1443
59. Yamagashi H, Srivastava D. Unravelling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome. *Trends Mol Med*. 2003. 9:383
60. Chieffo C., Garvey N., Gong W., Roe B., Zhang G., Silver L., Emanuel B.S., Budarf M.L. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse *Tbx1* gene. *Genomics*. 1997. 43:267
61. Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, Amati F, Mari A, Calabrese G, et al. uFd11, a developmentally expressed ubiquitination gene, is deleted in CAATCH 22 syndrome. *Hum Molec Genet*. 1997. 6:259

62. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet.* 1997. 34:798
63. Perez E, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *Curr Opin Pediatr.* 2002. 14(6):678
64. Sullivan KE. The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004. 4:505
65. Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, et al. Lack of correlation between impaired T cell production, immunodeficiency, and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998. 86:141
66. R. Gennery. Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2012. 69(1):17
67. Markert ML, Hummell DS, Rosenblatt HM et al. Complete DiGeorge syndrome: persistence of profound immunodeficiency. *J Pediatr.* 1998. 132:15
68. Martin Mateos MA, Perez Duenas BP, Iriando M, Krauel J, Gean Molins E. Clinical and immunological spectrum of partial DiGeorge syndrome. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2000. 10:352
69. Sediva A, Bartunkova J, Zachova R, Polouckova A, Hrusak O, Janda A, et al. Early development of immunity in DiGeorge syndrome. *Med Sci Monit.* 2005. 11:182
70. Shah SS, Lai SY, Ruchelli E, Kazahaya K, Mahboubi S. Retropharyngeal aberrant thymus. *Pediatrics.* 2001. 108:E94

71. Sirianni MC, Businco L, Fiore L, Seminara R, Aiuti F. T-cell subsets and natural killer cells in DiGeorge and SCID patients. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1983. 19(3):107
72. Piliero LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood.* 2004. 103(3):1020
73. Kanaya Y, Ohga S, Ikeda K, Furuno K, Ohno T, Takada H, Kinukawa N, Hara T. Maturation alterations of peripheral T cell subsets and cytokine gene expression in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2006. 144(1):85
74. J. Chinen, H.M. Rosenblatt, E.O. Smith, W.T. Shearer, L.M. Noroski, Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. 111:573
75. Patel K, Akhter J, Kobrynski L, Benjamin Gathmann MA, Davis O, Sullivan KE. Immunoglobulin deficiencies: the B-lymphocyte side of DiGeorge Syndrome. *J Pediatr.* 2012. 161(5):950
76. DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev.* 2006. 66(10 Suppl 2):S73
77. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev.* 2008. 66(10 Suppl 2):S182
78. Tai C. Chen, Zhiren Lu, and Michael F. Holick. Photobiology of Vitamin D. *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications* 2nd Edition. 2010. Pag. 35
79. Havinga E. Vitamin D, example and challenge. *Experientia.* 1973. 29:1181
80. Woodward RB, Hoffmann R. Selection rules for sigmatropic reactions. *J Am Chem Soc.* 1965. 87:2511

81. Glenville Jones, Metabolism and Catabolism of Vitamin D, Its Metabolites and Clinically Relevant Analogs. Vitamin D: Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications 2nd Edition. 2010. Pag. 57
82. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *New England J Med.* 1989. 320:981
83. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev.* 1989. 10:294
84. Dusso AS, Negrea L, Gunawardhana S, et al. On the mechanisms for the selective action of vitamin D analogs. *Endocrinology.* 1991. 128:1687
85. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, et al. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant.* 2010. 25:2850
86. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2005. 289:F8
87. Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, et al. Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. *Kidney Int.* 2003. 64:414
88. Liu W, Yu WR, Carling T, et al. Regulation of gp330/megalyn expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest.* 1998. 28:100
89. Yamane T, Takeuchi K, Yamamoto Y, et al. Legumin from bovine kidney: its purification, molecular cloning, immunohistochemical localization and degradation of annexin II and vitamin D-binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 2002. 1596:108
90. Adams JS, Chen H, Chun RF, et al. Novel regulators of vitamin D action and metabolism: lessons learned at the Los Angeles zoo. *J Cell Biochem.* 2003. 88:308

91. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell*. 1999. 96:507
92. Brandi L. 1 α (OH)D₃ One-alpha-hydroxy-cholecalciferol an active vitamin D analog. Clinical studies on prophylaxis and treatment of secondary hyperparathyroidism in uremic patients on chronic dialysis. *Dan Med Bull*. 2008. 55:186
93. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, et al. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95:1387
94. Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, "Harrison's Principles of Internal Medicine", 17th Edition, 2008.
95. Dong X, Lutz W, Schroeder TM, et al. Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. 102:16007
96. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008. 4:404
97. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008. 88:491S .
98. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extrarenal 1 α -hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol*. 2004. 215:31
99. Sutton ALM, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol*. 2003. 17:777
100. Strugnell SA, Deluca HF. The vitamin D receptor-- structure and transcriptional activation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997.215:223

101. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*. 1992. 355:446
102. Cheskis B, Freedman LP. Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D3 receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol*. 1994. 14:3329
103. Pasquali M, Mandanici G, Conte C, Muci ML, Mazzaferro S. Understanding the different functions of vitamin D. *G Ital Nefrol*. 2009. 26 Suppl 46:53
104. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007. 357:266
105. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*. 2005. 85(1):373
106. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007. 9(Suppl. 1):S1
107. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012. 76(3):315
108. Grad, R. Cod and the consumptive: a brief history of cod-liver oil in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharmacy in History*. 2004. 46:106
109. Rook, G.A., Steele, J., Fraher, L. *et al.* Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology*. 1986. 57:159
110. Koeffler, H.P., Reichel, H., Bishop, J.E. *et al.* gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by normal human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985. 127:596

111. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 2005. 17:1
112. Liu, P.T., Stenger, S., Li, H. *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006. 311:1770
113. Wang, T.T., Nestel, F.P., Bourdeau, V. *et al.* Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *Journal of Immunology*. 2004. 173:2909
114. Gombart, A.F., Borregaard, N. & Koeffler, H.P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB Journal*. 2005. 19:1067
115. Edfeldt, K., Liu, P.T., Chun, R. *et al.* T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107:22593
116. Hewison M., Vitamin D, Immunity and Human Disease, *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 2010. 8:32
117. Adorini, L., Penna, G., Giarratana, N. *et al.* Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003. 88:227
118. Brennan A., Katz D.R., Nunn J.D., Barker S., Hewison M., Fraher L.J., O’Riordan J.L.. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D₃ metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology*. 1987. 61:457

119. Dam, T.N., Moller, B., Hindkjaer, J., Kragballe, K. The vitamin D3 analog calcipotriol suppresses the number and antigen-presenting function of Langerhans cells in normal human skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1996. 1:72
120. Penna, G., Adorini, L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* 164, 2405–2411.; Griffin, M.D., Lutz, W.H., Phan, V.A., Bachman, L.A., McKean, D.J., Kumar, R., 2000. Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. 270:701
121. Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Davalli, A.M., Adorini, L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J. Immunol.* 2001. 167:1945
122. Hewison, M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010. 321:103
123. Hewison, M., Freeman, L., Hughes, S.V. *et al.* Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* 2003. 170:5382
124. Bikle DD. Vitamin D and Immune Function: Understanding Common Pathways, *Current Osteoporosis Reports.* 2009. 7:58
125. Adorini L, Giarratana L, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells, *Seminars in Immunology.* 2004. 16:127
126. Romagnoli E, Caravella P, Scarnecchia L, Martinez P, Minisola S. Hypovitaminosis D in an Italian population of healthy subjects and hospitalized patients. *Br J Nutr.* 1999. 81(2):133

127. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage, *Nature Rev. Immunol.* 2008. 8:685
128. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C and Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system, *Curr Opin Pharmacol.* 2010. 10:1
129. Zhu KJ, Zhou WF, Zheng M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues modulate the phagocytosis of human monocyte-derived dendritic cells. *Yao Xue Xue Bao.* 2002. 37(2):94
130. Rigby WF, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J Clin Invest.* 1984. 74(4):1451
131. Rigby WF, Noelle RJ, Krause K, Fanger MW. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human T lymphocyte activation and proliferation: a cell cycle analysis. *J Immunol.* 1985. 135(4):2279
132. Manolagas SC, Wertz DA, Tsoukas CD, Provvedini DM, Vaughan JH. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Lab Clin Med.* 1986. 108(6):596
133. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009. 183(9):5457
134. Chen L, Cencioni MT, Angelini DF, Borsellino G, Battistini L, Brosnan CF. Transcriptional profiling of gamma delta T cells identifies a role for vitamin D in the immunoregulation of the V gamma 9V delta 2 response to phosphate-containing ligands, *J Immunol.* 2005. 174(10):614452.
135. Baroncelli G I, Vierucci F, Bertelloni S. Profilassi dell'ipovitaminosi D nel lattante e nel bambino

136. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline.; Endocrine Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011. 96(7):1911
137. C. Valtriani, C. Hurle. Citofluorimetria a flusso: aspetti generali con riferimento particolare allo studio di alcune malattie ematologiche. *Caleidoscopio Italiano*, n. 113, 1997.
138. Orsini G, Legitimo A, Failli A, Massei F, Biver P, Consolini R. Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *Int Immunol.* 2012 . 24(6):347
139. Zemble R, Luning Prak E, McDonald K, McDonald-McGinn D, Zackai E, Sullivan K. Secondary immunologic consequences in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Immunol.* 2010. 136(3):409
140. Chinen J, Shearer WT. Advances in basic and clinical immunology in 2011. *J Allergy Clin Immunol.* 2012. 129(2):342
141. McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, Gennery AR Immunologic defects in 22q11.2 deletion syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2008. 122(2):362
142. Tison BE, Nicholas SK, Abramson SL, Hanson IC, Paul ME, Seeborg FO, Shearer WT, Perez MD, Noroski LM, Chinen J. Autoimmunity in a cohort of 130 pediatric patients with partial DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011. 128(5):1115
143. Lemoli R M, Curti A, Cellini C, Tosi P, Ferri E, Terragna C, Isidori A, Cavo M, Baccarani M. Cellular immunotherapy for multiple myeloma: from the bench to the bed side. *Blood Transfus.* 2005. 3:42

144. Ferdousi Chowdhury, Peter Johnson, Anthony Peter Williams. Enumeration and Phenotypic Assessment of Human Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells in Whole Blood. *Cytometry Part A*. 2010. 77A:328
145. Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Kimura H, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Reduced blood BDCA-21 (lymphoid) and CD11c1 (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2005. 142:84
146. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, McInnes IB. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006. 8:R15.
147. Sciarra A, Lichtner M, Autran GA, Mastroianni C, Rossi R, Mengoni F, Cristini C, Gentilucci A, Vullo V, Di SF. Characterization of circulating blood dendritic cell subsets DC1231 (lymphoid) and DC11C1 (myeloid) in prostate adenocarcinoma patients. *Prostate*. 2007. 67:1
148. Perez-Cabezas B, Naranjo-Gomez M, Fernandez MA, Grifols JR, Pujol-Borrell R, Borrás FE. Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors. *Exp Gerontol* 2007;42:1033–1038.
149. Pinzon-Charry A, Maxwell T, López JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol. Cell Biol*. 2005;83:451
150. Orsini G, Legitimo A, Failli A, Ferrari P, Nicolini A, Spisni R, Miccoli P, Consolini R. Quantification of Blood Dendritic Cells in Colorectal Cancer Patients During the Course of Disease. *Pathol Oncol Res*. 2013 Sep 11. [Epub ahead of print]
151. Failli A, Legitimo A, Orsini G, Romanini A, Consolini R. Numerical defect of circulating dendritic cell subsets and defective dendritic cell generation from monocytes of patients with advanced melanoma. *Cancer Lett*. 2013. 337(2):184

152. Vlad G, Chang CC, Colovai AI, Berloco P, Cortesini R, Suci-Foca N. Immunoglobulin-like transcript 3: a crucial regulator of dendritic cell function. *Hum. Immunol.* 2009. 70:340
153. Suci-Foca N, Cortesini R. Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade. *Cell. Immunol.* 2007. 248:59
154. Moukayed M, Grant WB. Molecular Link between Vitamin D and Cancer Prevention. *Nutrients.* 2013. 5(10):3993
155. Wonmo Kang, Sujin Lee, Eunyi Jeon, Ye-Rang Yun, Kook-Hyun Kim, Jun-Hyeog Jang Emerging role of vitamin D in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2011. 3(8):123
156. Institute of Medicine Committee to review Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington (DC): National Academies Press. 2011
157. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012. 97(4):1153
158. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone B E, Dal Cin E, Allavena P and Di Carlo V. Vitamin D3 Affects Differentiation Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells, *J Immunol.* 2000. 164:4443
159. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2007. 178(1):145
160. Herwadkar A, Gennery AR, Moran AS, Haeney MR, Arkwright PD. Association between hypoparathyroidism and defective T cell immunity in 22q11.2 deletion syndrome. *J Clin Pathol.* 2010. 63(2):151