

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica

Dottorato di Ricerca in

SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE

(Settore scientifico-disciplinare MED13)

XXII Ciclo

Ipotesi di nuovi approcci farmacologici per il trattamento  
della malattia di Graves: studio degli effetti anti-  
infiammatori di agonisti di PPAR $\gamma$  e di analoghi della  
vitamina D

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Gianni Forti

Tutor:

Prof.ssa Michaela Luconi

Dottoranda:

Dr.ssa Elisa Borgogni

---

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>1. PATOGENESI DELLE MALATTIE AUTOIMMUNI.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MECCANISMI DELLA TOLLERANZA IMMUNITARIA.....</b>	<b>2</b>
<b>3. I LINFOCITI CD4+.....</b>	<b>6</b>
<b>4. LE CITOCINE.....</b>	<b>9</b>
4.1. IFN- $\gamma$ .....	11
4.2. TNF- $\alpha$ .....	13
<b>5. LE CHEMOCINE.....</b>	<b>16</b>
5.1. Le chemochine e la regolazione del movimento leucocitario.....	18
5.2. Le chemochine e la regolazione delle risposte Th1/Th2.....	20
5.3. Le chemochine-CXC indotte dall'IFN- $\gamma$ ed il recettore CXCR3.....	21
5.4. Le chemochine nelle malattie autoimmuni .....	25
<b>6. LA MALATTIA DI GRAVES.....</b>	<b>26</b>
6.1. Patogenesi e progressione: l'asse CXCL10/CXCR3 .....	27
6.2. I livelli sierici di CXCL10 nella malattia di Graves .....	33
<b>7. IL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO DELLA MALATTIA DI GRAVES.....</b>	<b>35</b>
7.1. I farmaci antitiroidei: metimazolo.....	36
7.1.1. Effetti immunomodulatori del metimazolo.....	38
7.2. Gli analoghi della vitamina D: elocalcitololo .....	39
7.2.1. Effetti immunomodulatori degli analoghi della vitamina D .....	44
7.3. Agonisti di PPAR $\gamma$ : rosiglitazone .....	48
7.3.2. Effetti anti-infiammatori dei tiazolidinedioni .....	51

---

<b>SCOPO DELLA RICERCA.....</b>	<b>54</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>56</b>
1. Chemicals.....	56
2. Colture cellulari di tireociti umani.....	57
3. Colture cellulari di linfociti CD4+ umani.....	58
4. Saggi di secrezione di citochine.....	59
5. Dosaggi ELISA.....	60
6. Estrazione dell'RNA.....	61
7. Real-Time PCR.....	63
8. Analisi citofluorimetrica.....	64
9. Analisi Western blot.....	64
10. Microscopia ad immunofluorescenza.....	66
11. Analisi statistica.....	67
<b>RISULTATI.....</b>	<b>69</b>
1. Caratterizzazione del modello sperimentale di tireociti umani.....	69
2. Effetto delle citochine pro-infiammatorie sulla secrezione di CXCL10 nei tireociti umani.....	71
3. Studio dell'effetto sinergico di IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .....	74
4. Azione di metimazolo, di rosiglitazone e di elocalcitolo sui tireociti umani	76
4.1. Effetto sulla secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine pro- infiammatorie.....	76
4.2. Effetto sull'up-regolazione di IFNR indotta da TNF- $\alpha$ .....	79
4.3. Modulazione del <i>signaling</i> intracellulare delle citochine pro- infiammatorie.....	81
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>89</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>102</b>

# INTRODUZIONE

## 1. Patogenesi delle malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni sono condizioni patologiche causate da autoimmunità, ovvero da una reazione alterata del sistema immunitario dovuta a fattori multipli di tipo genetico ed ambientale (Rotondi *et al.* 2007). La principale caratteristica del sistema immunitario è quella di reagire con un'enorme varietà di antigeni diversi mediante recettori specifici. Normalmente il sistema immunitario è capace discriminare tra antigeni propri (*self*) e antigeni non propri, ma se i meccanismi di controllo falliscono il sistema immunitario può attaccare le cellule e i tessuti propri dando origine alla comparsa di malattie autoimmuni.

La “rottura” dei meccanismi della tolleranza immunitaria verso il *self* può verificarsi a causa dell'attivazione di linfociti T e B self-reattivi oppure per alterazioni nella natura o nella presentazione degli antigeni da essi riconosciuti, determinando reazioni infiammatorie croniche nei tessuti target (Rotondi *et al.* 2007).

Si stima che circa il 5-10% della popolazione sia affetta da malattie autoimmuni e in letteratura sono descritte oltre 80 malattie, quasi tutte ad accertata eziologia autoimmune (Simmonds *et al.* 2005), che possono essere classificate in due principali categorie:

- malattie *organo-specifiche*, in cui i linfociti autoreattivi, non controllati dai circuiti di tolleranza, portano alla distruzione dei tessuti di un intero organo bersaglio, come la tiroide nella malattia di Graves o nella tiroidite di Hashimoto, o le cellule  $\beta$  delle isole di Langerhans nel diabete mellito insulino-dipendente.
- malattie *non organo-specifiche o sistemiche*, caratterizzate da lesioni infiammatorie diffuse a numerosi organi e apparati, esemplificate dal Lupus Eritematoso Sistemico (LES).

Sebbene l'immunopatogenesi delle malattie autoimmuni sistemiche ad oggi rimanga non completamente chiarita, i meccanismi effettori coinvolti nell'autoimmunità organo-specifica sono stati principalmente correlati all'attività delle cellule T helper (Th) CD4+ e T citotossici (Tc) CD8+ (Rotondi *et al.* 2007). Le malattie autoimmuni seguono un corso progressivo che determina una completa distruzione tissutale, attraverso la perpetuazione della risposta infiammatoria, dovuta all'azione di molecole costimolatorie, citochine e chemochine che modulano il reclutamento, il *trafficking* e la localizzazione *in situ* di specifici *subsets* di linfociti attivati (Rotondi *et al.* 2007). Il risultato finale è la rottura dei meccanismi fisiologici che controllano i linfociti autoreattivi, con perdita di tolleranza o ignoranza immunologica. (Makay *et al.* 2001; Rotondi *et al.* 2007).

## 2. Meccanismi della tolleranza immunitaria

La funzione primaria del sistema immunitario è di preservare l'identità biologica dell'individuo (*self*) eliminando possibili fonti d'antigeni estranei (*nonself*), quali batteri e cellule infettate da virus. Ciò richiede una precisa discriminazione fra *self* e *nonself* e questa essenziale caratteristica del sistema immunitario si è evoluta a un complicato livello di complessità nei vertebrati superiori. La strategia di base è stata quella di generare un vasto repertorio di linfociti, ciascuno con differente recettore antigene-specifico, e di inattivare funzionalmente (anergizzare) o portare a morte quelli reattivi contro antigeni *self*, senza alterare la maturazione dei linfociti reattivi per antigeni *nonself* (Romagnani S. 2006).

Il successo del sistema immunitario nel combattere l'attacco dei patogeni è basato sull'abilità dei linfociti T, non solo di riconoscere gli agenti estranei, ma anche di coordinare la loro eliminazione. In molti casi il sistema è molto efficace da eliminare il patogeno senza lasciare danni al tessuto ospite, ma in particolari condizioni, come nelle malattie autoimmuni o nel trapianto d'organo non completamente compatibile, i linfociti T mediano risposte infiammatorie inappropriate e quindi dannose per l'organismo (Norman MU. *et al.* 2005).

L'incontro tra un linfocita maturo e l'antigene dà luogo ad attivazione, proliferazione e differenziazione funzionale.

Il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T prevede vari steps:

- captazione dell'antigene da parte di cellule capaci di presentare l'antigene (*antigen presenting cell*, APC)
- processazione dell'antigene tramite proteolisi intracellulare
- legame di peptidi derivati dalla frammentazione dell'antigene a molecole codificate dal complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC)
- espressione sulla superficie delle APC dei complessi peptide-MHC.

L'MHC è un gruppo di geni altamente polimorfici che nell'uomo prende il nome di *Human Leukocyte Antigen* (HLA). Esistono due principali classi di geni, che codificano per le molecole di Classe I (HLA-A, B, C) e di classe II (HLA-DR, DP, DQ), le quali presentano i peptici antigenici ai linfociti T.

Le molecole MHC di classe I sono espresse su tutte le cellule nucleate, mentre quelle di classe II sono espresse su APC professionali, come cellule dendritiche (*dendritic cell*, DC), macrofagi e linfociti B.

I linfociti T utilizzano il loro recettore (*T cell receptor*, TCR) per riconoscere il complesso MHC-antigene presentato dalle APC. Il legame tra TCR e il complesso MHC-antigene porta all'attivazione del linfocita T, attraverso una caratteristica catena di trasduzione del segnale, attraverso proteine transmembrana, come CD3, inducendo l'attivazione della sintesi, fra l'altro, di interleuchine e dei loro recettori (Lanzavecchia *et al.* 2001)

Il segnale trasmesso dal TCR, affinché il linfocita si attivi, deve essere associato al segnale proveniente da specifici co-recettori, noti come CD4 e CD8. La presenza di queste due specifiche molecole sulla membrana dei linfociti T permette di distinguere fra linfociti Th CD4+ e linfociti Tc CD8+ e pertanto le molecole HLA di classe I e II hanno, un ruolo differente: le molecole di classe I presentano antigeni cellulari ai linfociti T CD8+, mentre quelle di classe II presentano antigeni peptidici ai linfociti T CD4+.

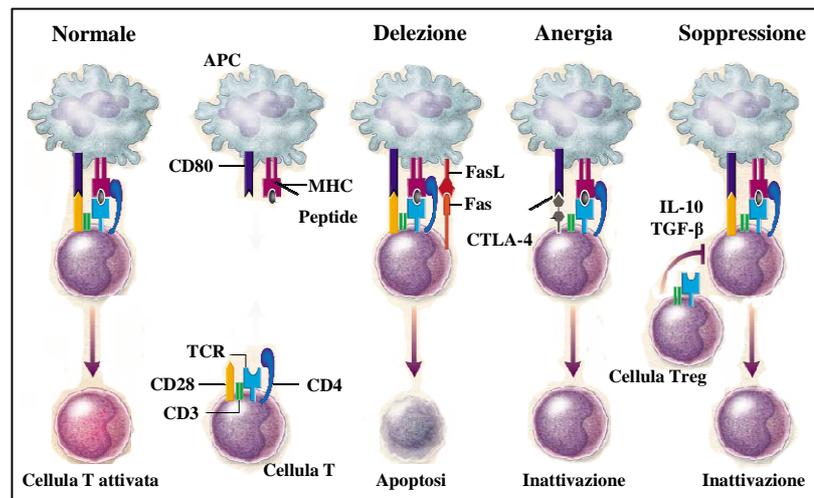
Per l'attivazione del linfocita è inoltre necessario anche il legame con molecole

accessorie, quali CD54 e CD58 sulle APC che interagiscono con CD18 e CD2 sulle cellule T e costimolatorie, quali CD40, CD80 e CD86 espressi dalle APC che interagiscono con CD154 e CD28 espressi su cellule T (Davis *et al.* 2003).

Quando i linfociti interagiscono con antigeni complementari al loro TCR, in dipendenza dei co-recettori coinvolti, possono essere stimolati a proliferare oppure a morire: è in questo modo che viene attuata la tolleranza verso gli autoantigeni. Esistono due principali modalità di induzione della tolleranza immunologica, la tolleranza centrale e la tolleranza periferica (Romagnani S. 2006).

La tolleranza centrale si sviluppa durante la linfopoiesi nel timo, dove i linfociti T immaturi, dotati di recettori ad alta affinità nei confronti degli autoantigeni, incontrano il rispettivo self-antigene. I linfociti T autoreattivi vanno incontro a un processo di morte programmata o apoptotica, designata selezione negativa. Come conseguenza tra i linfociti T CD4+ o CD8+ maturi che lasciano il timo, non vi sono più cellule capaci di riconoscere gli autoantigeni presenti a livello timico. In modo simile, le cellule B immature ricevono segnali di delezione dai self-antigeni nel midollo osseo (Starr *et al.* 2003). Bisogna però sottolineare che la maturazione dei linfociti T avviene prevalentemente durante la vita fetale, quando ancora non tutti i tessuti sono formati e non tutti gli antigeni umani sono disponibili a livello timico per operare la selezione negativa dei linfociti T. Esistono, infatti, numerosi cloni di linfociti maturi che sfuggono al processo di selezione negativa per mancanza di contatto con gli autoantigeni e che sono quindi potenzialmente autoreattivi.

La tolleranza periferica è più importante che quella centrale per mantenere la tolleranza nei confronti di quegli autoantigeni che non sono rappresentati a livello timico o midollare, ma sono invece espressi nei tessuti periferici linfoidi secondari. La tolleranza periferica nei confronti dei linfociti T autoreattivi può verificarsi attraverso tre meccanismi principali (Makay *et al.* 2001) (Fig.1):



**Fig.1 Meccanismi di tolleranza periferica.** *Delezione:* le cellule T esprimenti sulla superficie cellulare Fas possono ricevere segnali da cellule APCs esprimenti FasL e andare in contro ad apoptosi. *Anergia:* CTLA-4 si lega a CD80 sulle APCs inibendo l'attivazione delle cellule T. *Soppressione:* le cellule Treg possono inibire altre cellule T attraverso la produzione di citochine inibitorie (IL-10 e TGF-β). (da Makay *et al.* 2001)

1. *Anergia clonale:* è uno stato di non responsività funzionale che si verifica in due particolari condizioni. Nel corso di processi infiammatori altre cellule oltre alle APC professionali (cellule epiteliali, endoteliali, ecc...) possono esprimere le molecole MHC di classe II e quindi sono in grado di presentare l'antigene al linfocita T, ma non essendo espresse sulla loro superficie le molecole costimolatorie (come CD80 e CD86), l'attivazione delle cellule T non può avvenire (Powell JD. 2006). Lo stato di anergia clonale si osserva anche quando la molecola inibitoria CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen*), presente sulla superficie del linfocita T, interagisce con un co-recettore delle APC sottraendolo al legame con le molecole attivatrici.
2. *Delezione clonale:* avviene in seguito alla persistente stimolazione da parte dell'antigene, che è in un processo noto come morte cellulare indotta dall'attivazione, una forma di apoptosi indotta da segnali che originano da recettori "di morte" presenti sulla membrana, i più importanti dei quali sono Fas e il suo ligando FasL.

3. *Immunosoppressione da linfociti T regolatori (Treg)*: alcune risposte immunitarie verso autoantigeni sono inibite da linfociti “soppressori” che producono citochine (TGF- $\beta$  e IL-10) capaci di bloccare l'attivazione e le funzioni dei linfociti T effettori. Queste cellule sono chiamate *natural Treg* e comprendono cellule *natural killer T* (NKT) e cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

Il processo d'autoimmunizzazione avviene sia attivando nelle aree infiammatorie l'espressione delle molecole costimolatorie e di citochine da parte delle APC tissutali altrimenti in fase di riposo, sia favorendo la trasformazione di autoantigeni in neoantigeni parzialmente *cross*-reattivi, sia provocando la liberazione di autoantigeni normalmente “sequestrati” e inaccessibili per il sistema immunitario. Inoltre, alcuni agenti infettivi possono condividere antigeni “cross”-reattivi con autoantigeni, tali da indurre una risposta immune, che interessa anche il *self* (*molecular mimicry*) (Blank *et al.* 2007).

I processi fisiologici d'induzione e mantenimento della tolleranza da parte del sistema immunitario nei confronti del *self* sono molteplici e possono essere alterati sia a causa d'anomalie di tipo genetico, che coinvolgono più frequentemente i geni di MHC e in particolare quelli di classe II, ovvero gli stessi geni coinvolti nella presentazione degli antigeni ai linfociti, sia soprattutto in seguito a fattori di tipo ambientale, come traumi, ischemie, infezioni e condizioni ormonali (Simmonds *et al.* 2005).

### **3. I linfociti CD4<sup>+</sup>**

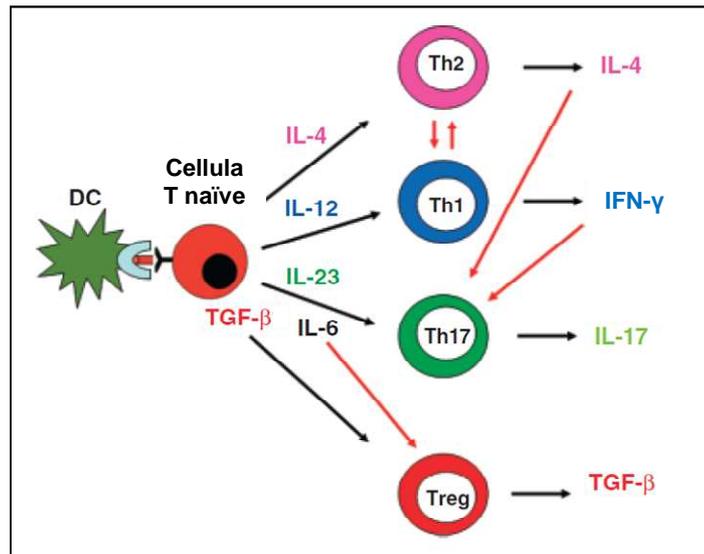
I linfociti T CD4<sup>+</sup> rappresentano una famiglia eterogenea di cellule, che gioca un ruolo importante sia nella protezione sia nell'immunopatologia. Da un punto di vista fisiologico, le cellule T possono essere suddivise in due principali *subsets*: le cellule T effettrici che provvedono alla protezione verso gli agenti offensivi esogeni e le cellule Treg che provvedono alla protezione contro le reazioni immunitarie eccessive o autoimmuni (Romagnani S. *et al.* 2009).

Per un lungo periodo, le cellule T effettrici sono state divise in due principali tipi,

denominati come CD4<sup>+</sup> Th di tipo 1 (Th1) e di tipo 2 (Th2), in base al diverso pannello di citochine prodotte. Le cellule Th1 producono IL-2, IFN- $\gamma$ , linfotossina- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ , e non sono in grado di produrre IL-4, IL-5 o IL-9, mentre quelle Th2 producono citochine diverse, come IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 ma non IFN- $\gamma$  (Mosmann *et al.* 1989; Romagnani S. 1991). Quando le cellule T CD4<sup>+</sup> naïve sono stimolate per la prima volta, non sono né di tipo Th1 né Th2 e secernono piccole quantità di varie citochine, tra cui IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$ : questo stato è detto Th0 (Fig.2). La differenziazione delle cellule T naïve è influenzata dall'ambiente citochinico in cui avviene l'attivazione delle cellule T (Lafaille *et al.* 1998).

È stato dimostrato che lo sviluppo delle cellule Th1 si origina durante la risposta immunitaria primaria quando le cellule Th naïve sono attivate in presenza di IL-12, prodotta dalle DCs, spesso in associazione con IFN- $\gamma$ , prodotto da cellule NK in risposta all'interazione dei *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) con i *Toll-like receptors* (TLRs) presenti sulla superficie delle stesse cellule dell'immunità innata (Iwasaki *et al.* 2004), mentre le cellule Th2 si originano in presenza di IL-4 e in assenza di IL-12 (Le Gros *et al.* 1990). Inoltre le cellule Th1 e Th2 esprimono differenti fattori di trascrizione: le cellule Th1 esprimono principalmente STAT-4 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-4*) e T-bet, mentre le Th2, STAT-6, GATA-3 e c-maf (Szabo *et al.* 2003).

Le citochine prodotte dalle cellule Th1, in particolare IFN- $\gamma$ , attivano i macrofagi e favoriscono la produzione di IgG1 e IgG3 opsonizzanti e anticorpi fissanti il complemento, che proteggono dalle infezioni dovute a batteri intracellulari e alcuni virus (Abbas *et al.* 1996; Romagnani S. 1994). Invece, le citochine prodotte dalle cellule Th2 inducono la produzione di IgE da parte delle cellule B e il differenziamento e l'attivazione degli eosinofili, fornendo una bassa protezione verso la maggioranza degli agenti infettivi, tranne che per le infezioni gastrointestinali dovute ai nematodi (Abbas *et al.* 1996; Romagnani S. 1994).



**Fig.2 Il complesso network delle cellule T CD4+ effettrici e regolatorie.** La produzione di IL-4 promuove (*freccia nera*) lo sviluppo delle cellule Th2 e inibisce (*freccia rossa*) quello delle cellule Th1 e Th17, mentre la produzione di IL-12 favorisce lo sviluppo delle cellule Th1 e la produzione di IL-23 risulta nello sviluppo di cellule Th17. Sia TGF-β1, che promuove lo sviluppo delle cellule Treg, sia IL-6 contribuiscono allo sviluppo delle Th17. IFN-γ inibisce lo sviluppo delle cellule Th2, mentre IL-6 inibisce quello delle cellule Treg. (da Romagnani S. 2006)

I linfociti di tipo Th1 sembrano quindi coinvolti nella patogenesi delle malattie infiammatorie caratterizzate dalla formazione di granulomi, come le malattie autoimmuni, le sarcoidosi, la malattia di Crohn e l'aterosclerosi, mentre i Th2 sembrano coinvolti nello sviluppo dei processi infiammatori di tipo allergico (Romagnani S 2006).

In realtà, le cellule Th1 e Th2 non sono due distinti *subsets* di linfociti CD4+, ma due forme estremamente polarizzate di cellule Th CD4+ che mediano la risposta immunitaria adattativa.

Più recentemente, un nuovo tipo di cellule T CD4+ effettrici è stato caratterizzato sia nel topo sia nell'uomo (Annunziato *et al.* 2007). Queste cellule sono state denominate Th17, perché la citochina principale che producono è l'IL-17 e sembra che svolgano un ruolo importante nella patogenesi di patologie infiammatorie e malattie autoimmuni, come l'artrite reumatoide, il LES e l'encefalite autoimmune (Langrish *et al.* 2005).

## 4. Le citochine

Le citochine (*cytokines*, dal greco *cyto*, cellula, e *kinos*, movimento) sono potenti mediatori proteici solubili che permettono le comunicazioni tra le cellule e l'ambiente esterno (Tayal *et al.* 2008). Mediano molte funzioni, in particolare regolano l'immunità, l'infiammazione, l'ematopoiesi, la proliferazione e la differenziazione delle cellule immunitarie.

Le citochine generalmente agiscono a breve distanza, in tempi brevi e a concentrazione molto bassa; possono avere un effetto sulla stessa cellula che l'ha secreta (azione autocrina) o su cellule adiacenti (azione paracrina). Alcune citochine possono invece agire in modo endocrino, modificando il comportamento di cellule facenti parte di tessuti o organi molto distanti.

Le citochine non sono costitutivamente espresse, ma sono sintetizzate e secrete in risposta a stimoli inducenti, prodotti principalmente da linfociti Th e da macrofagi, ma anche da cellule di tipo non immune, come fibroblasti, cellule endoteliali, cellule epiteliali (Tayal *et al.* 2008).

Il termine "citochina" è molto generico e comprende le linfochine (citochine prodotte dai linfociti), le monochine (prodotte dai monociti), le interleuchine (che hanno come target principale i leucociti), i *colony stimulating factors* (CSFs), gli interferoni (*Interferons*, IFNs), i fattori di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNFs) e le chemochine (citochine che mediano la chemiotassi tra le cellule).

Le citochine presentano attività pleiotropiche, in quanto possono agire su differenti cellule target esercitando funzioni diverse, ed inoltre una determinata citochina può essere secreta da diversi tipi cellulari. La loro attività è ridondante, perché due o più citochine possono determinare azioni simili. Inoltre, due o più citochine sono anche in grado di agire in modo sinergico, determinando un effetto maggiore dell'effetto delle singole citochine, oppure antagonizzando l'azione delle altre citochine.

Le citochine agiscono legandosi a specifici recettori di membrana. Esistono cinque famiglie di recettori con differenti strutture e vie di trasduzione del

segnale:

1. *famiglia delle ematopoietine (recettori di tipo I)*: sono dimeri o trimeri con cisteine conservate nei domini extracellulari e una sequenza conservata Trp-Ser-X-Trp-Ser; legano ad esempio IL-2 e usano una via di trasduzione mediata da JAK e STAT.
2. *famiglia degli IFN (recettori di tipo II)*: hanno dei residui di cisteina come i recettori di tipo I, ma non la sequenza Trp-Ser-X-Trp-Ser; legano IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e la trasduzione è uguale al tipo I.
3. *famiglia dei TNF*: hanno quattro domini extracellulari; legano TNF- $\alpha$  e  $\beta$ , FASL (che innesca il processo di apoptosi cellulare), CD40L (importante per l'attivazione dei linfociti B ed i macrofagi).
4. *superfamiglia delle immunoglobuline (Ig)*: comprendono i due recettori per IL-1, che modulano l'attivazione di NF- $\kappa$ B.
5. *famiglia dei recettori con sette eliche transmembrana (7-TM)*: legano le chemochine e per la trasduzione interagiscono con le proteine G.

Grosse alterazioni nella produzione di citochine sono state osservate nell'uomo in malattie di differente background eziologico, come malattie infiammatorie acute e croniche, malattie neurodegenerative, neoplasie (Zidek *et al.* 2009). Inoltre, la presenza di citochine pro-infiammatorie, come IFN- $\gamma$  e IL-2, è stata associata alla distruzione tissutale nelle malattie autoimmuni (Hill *et al.* 2002).

Molte malattie sono associate a *shift* nei livelli delle citochine Th1/Th2 e la restaurazione del giusto bilancio citochinico potrebbe essere la chiave per un intervento immunoterapico di successo (Murreille *et al.* 1998).

TNF- $\alpha$  ed IFN- $\gamma$  sono le principali citochine di tipo pro-infiammatorio e durante una risposta infiammatoria vascolare di tipo Th1 coordinano l'interazione tra cellule residenti, il tessuto infiammato ed i linfociti e macrofagi infiltranti. IFN- $\gamma$ , secreto dai linfociti T attivati, rappresenta la principale citochina di tipo Th1, mentre TNF- $\alpha$ , secreta da monociti/macrofagi e cellule residenti, è considerato una citochina ad azione pleiotropica, coinvolta in una generica risposta infiammatoria.

## 4.1. IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  appartiene alla famiglia delle citochine, dette interferoni, che sono generalmente classificate in due classi, in accordo con la loro omologia di sequenza ed il recettore che legano (Stark *et al.* 1998).

Gli IFNs di tipo I comprendono IFN- $\alpha$  ed i suoi sottotipi, IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$  ed inducono principalmente azioni di tipo anti-proliferativo e anti-virale. Alla classe di tipo II appartiene solamente IFN- $\gamma$ , che è strutturalmente diverso dagli altri, è codificato da un locus cromosomico ben distinto (Pestka *et al.* 2004) e presenta attività anti-virali deboli, mentre attività immunomodulatorie molto potenti (Jonasch *et al.* 2001).

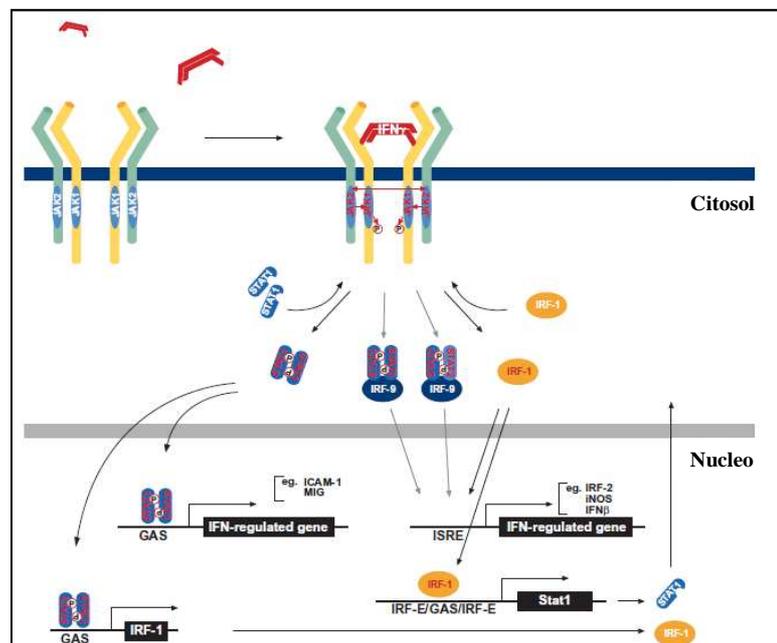
IFN- $\gamma$  è prodotto da linfociti CD4+ Th1, CD8+ Tc, cellule NK, cellule B e APCs, come macrofagi e DC (Schroder *et al.* 2004). La sua produzione è stimolata dalle citochine secrete dalle APCs, in particolare da IL-12 e IL-18, mentre è regolata in modo negativo da IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  (Schindler *et al.* 2001).

IFN- $\gamma$  attiva meccanismi antimicrobici e antitumorali, determina un aumento del riconoscimento, del processamento e della presentazione dell'antigene sulle APCs tramite upregolazione delle molecole MHC di classe I e II, controlla la crescita, la maturazione e il differenziamento di numerosi tipi cellulari ed inoltre aumenta l'attività delle cellule NK, regola le funzioni dei linfociti B e dirige il *trafficking* leucocitario (Schroder *et al.* 2004).

Legandosi al recettore di membrana IFNR, IFN- $\gamma$  esercita i suoi effetti biologici. Il legame citochina-recettore attiva la via di *signaling* intracellulare “*JAK-STAT pathway*”, che coinvolgendo le proteine tirosino-chinasi JAK (*Janus Tyrosine Kinase*) e le proteine STAT, determina la modulazione della trascrizione di geni target (O'Shea *et al.* 2002).

Funzionalmente IFN- $\gamma$  è attivo come omodimero non covalente formato dall'auto-associazione di due catene polipeptidiche a orientamento antiparallelo, che lega IFNR, il quale è costituito da due catene IFNR1, per il legame con il ligando, associate a due catene IFNR2, che trasducono il segnale (Stark *et al.* 1998). Ai domini intracellulari di IFNR1 e IFNR2 sono associate due tirosin-chinasi JAK1 e

JAK2 (Bach *et al.* 1997), che si attivano per auto- e trans-fosforilazione dopo il cambiamento conformazionale del recettore indotto dal legame con il ligando e fosforilano IFNR1, per permettere l'ancoraggio dell'attivatore trascrizionale STAT-1 (Greenlund *et al.* 1994). STAT-1 agisce da substrato per l'attività chinastica di JAK, che lo fosforila in tirosina, determinando la formazione di omodimeri, che traslocano nel nucleo e si legano a specifici elementi di risposta (*interferon- $\gamma$ -Activation Site*, GAS) a livello del promotore dei geni regolati da IFN- $\gamma$ , regolandone la trascrizione genica (Platanias *et al.* 1999; Schroder *et al.* 2004) (Fig.3).



**Fig.3** Via di trasduzione del segnale di IFN- $\gamma$ . (da Schroder *et al.* 2004)

Le proteine STAT sono un gruppo di fattori trascrizionali citoplasmatici di cui si conoscono sette membri, STAT -1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6 che condividono una comune struttura a domini (Ihle *et al.* 2001). STATs differenti sono attivati da distinti gruppi di citochine, in particolare IFN- $\gamma$  è un potente attivatore di STAT-1, mentre IL-6 attivano principalmente STAT-3. È stato osservato che l'ingresso di STAT-1 nel nucleo avviene dopo circa 15 min dallo stimolo con IFN- $\gamma$ .ed è quasi completo dopo circa 30 min (Lillemeier *et al.* 2001).

## 4.2. TNF- $\alpha$

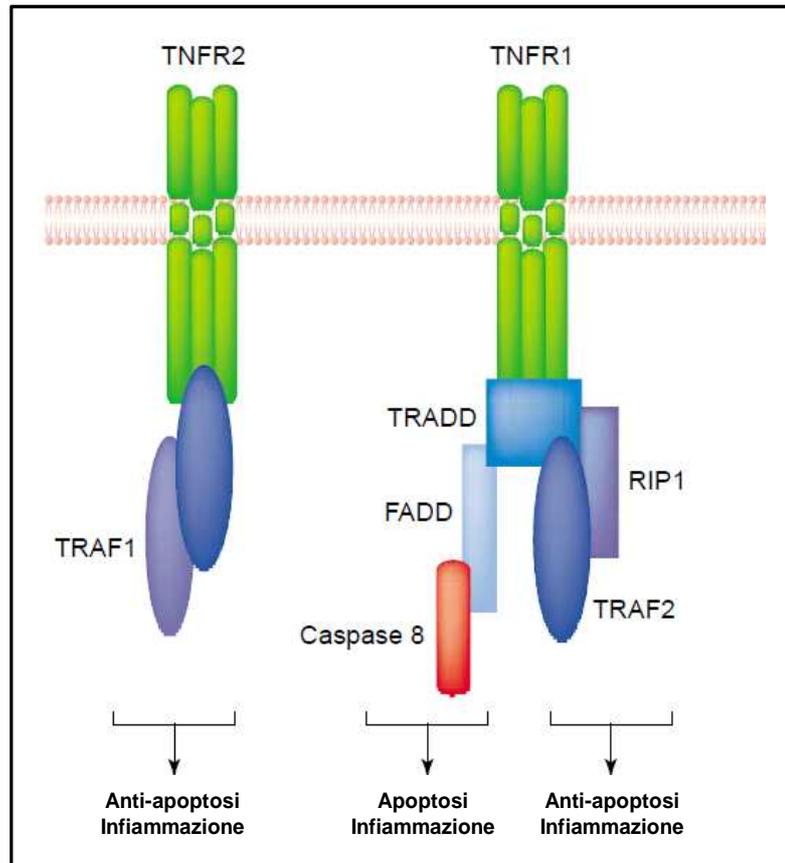
TNF- $\alpha$  è una potente citochina pro-infiammatoria che gioca un ruolo importante nell'immunità, nell'infiammazione, nel controllo della proliferazione, del differenziamento e dell'apoptosi (Baud *et al.* 2001).

Il TNF- $\alpha$  è una citochina omotrimerica molto potente, prodotta da molti tipi cellulari, come macrofagi, linfociti, cheratinociti e fibroblasti, in risposta a stimoli infiammatori, infettivi, a danno e altri cambiamenti ambientali (Tracey *et al.* 1993).

Il ruolo centrale di questa citochina nell'infiammazione è emerso dall'osservazione che topi *knockout* per il TNF- $\alpha$  o per il suo recettore hanno una risposta infiammatoria compromessa (Douni *et al.* 1995) e che, nell'uomo, gli inibitori del TNF- $\alpha$  (recettori solubili o anticorpi neutralizzanti) hanno un effetto terapeutico anti-infiammatorio (Feldmann *et al.* 2001).

TNF- $\alpha$  normalmente non è misurabile negli individui sani, ma livelli elevati nel siero e nei tessuti sono stati trovati in condizioni infiammatorie e infettive ed i livelli sierici correlano con la severità delle infezioni (Bradley JR. 2008) La produzione inappropriata di TNF- $\alpha$  è stata implicata nella patogenesi delle malattie infiammatorie sia acute sia croniche, come shock settico, AIDS, artrite e cancro (Liu Z. 2005).

L'esposizione cellulare al TNF- $\alpha$  può portare all'attivazione di varie vie di segnalazione intracellulare coinvolte in processi diversi, tra cui l'apoptosi, le risposte infiammatorie acute e croniche, a seconda del tipo di recettore coinvolto (Baud *et al.* 2001). Il TNF- $\alpha$  può interagire con due distinti recettori di membrana, TNFR1 (CD120a, p55/60) e TNFR2 (CD120b, p75/80), la cui espressione varia a seconda del tipo cellulare (Slowik *et al.* 1993). I domini extracellulari di TNFR1 e di TNFR2 possono essere tagliati proteoliticamente in frammenti recettoriali solubili con potenziale neutralizzante (Wallach *et al.* 1991). I due recettori non mostrano alcuna omologia nei loro domini intracellulari, suggerendo l'attivazione di differenti vie di segnale intracellulari (Liu Z. 2005) (Fig.4).



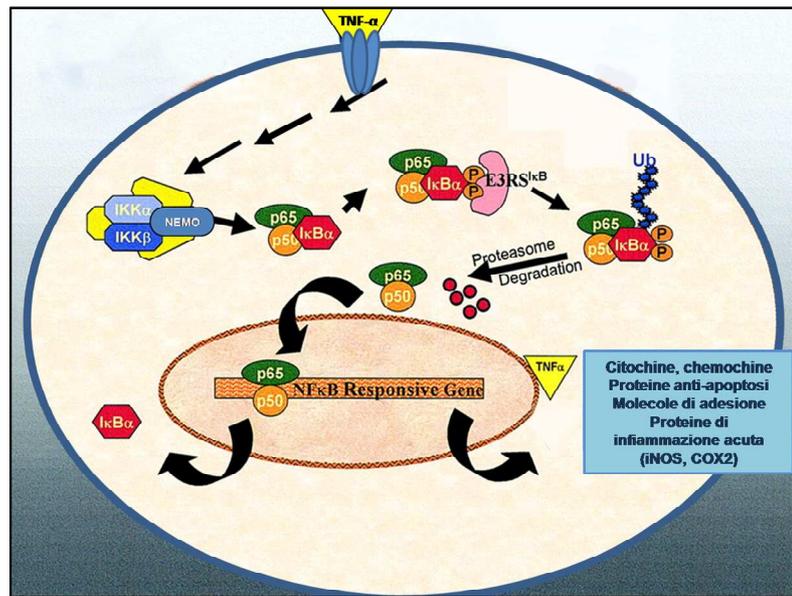
**Fig.4** Recettori per TNF- $\alpha$  e loro *pathways* di trasduzione intracellulare. (da Baud *et al.* 2001)

Per il *signaling* di TNFR1, il legame della citochina al dominio extracellulare determina la trimerizzazione del recettore ed il rilascio di una proteina inibitoria, SODD (*Silencer Of Death Domains*), dal dominio DD (*Death Domains*) intracellulare del TNFR1. La prima proteina reclutata è TRADD (*TNFR1-Associated Death Domain*), che funziona come piattaforma per il reclutamento di almeno altre tre proteine adattatrici: RIP-1 (*Receptor-Interacting Protein-1*), FADD (*Fas-Associated Death Domain*) e TRAF2 (*TNFR-Associated Factor 2*) (Baud *et al.* 2001; Liu Z. 2005), che a loro volta determinano l'attivazione dei fattori di trascrizione AP-1 (*Activator Protein-1*) e NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*), attraverso l'attivazione delle proteine chinasi JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), p38 and IKK (*I $\kappa$ B Kinase*).

Il legame del TNF- $\alpha$  a TNFR2 comporta un reclutamento diretto di TRAF2, che a sua volta recluta TRAF1 (Rothe *et al.* 1995). TRAF2 gioca un ruolo cruciale negli eventi (comuni ad entrambi i recettori del TNF- $\alpha$ ) che portano all'attivazione di IKK, di NF- $\kappa$ B e di proteine della famiglia di MAPK (*Mitogen Activated Protein-Kinase*).

NF- $\kappa$ B è uno dei fattori di trascrizione chiave che media molte risposte intracellulari indotte dal TNF- $\alpha$ . NF- $\kappa$ B è mantenuto inattivo nel citoplasma tramite interazione con proteine inibitorie chiamate I $\kappa$ Bs (Baeuerle *et al.* 1996) (Fig.5). In risposta al TNF- $\alpha$ , I $\kappa$ B è fosforilato dal complesso enzimatico citosolico inibitorio, detto IKK costituito da due proteine ad attività chinasi, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  ed una regolatrice detta NEMO, su residui di serina, è rapidamente ubiquitinato e poi degradato nel proteasoma (Karin *et al.* 2000). La degradazione di I $\kappa$ B determina la liberazione di NF- $\kappa$ B, che è in grado di traslocare nel nucleo e di attivare la trascrizione genica, andando a legarsi a specifiche sequenze di DNA nelle regioni *enhancer* di geni *target* (Baeuerle *et al.* 1996). È stato osservato che il processo di traslocazione avviene molto rapidamente entro 15 min dallo stimolo con TNF- $\alpha$ .

Il promotore del gene per il TNF- $\alpha$  contiene le sequenze di legame per NF- $\kappa$ B e AP-1 ed è quindi soggetto a un'autoregolazione di tipo positivo, una proprietà importante che garantisce l'amplificazione della risposta infiammatoria (Baud *et al.* 2001). Una volta nel nucleo, l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B può essere modulata tramite fosforilazione da parte di quelle proteine chinasi che a loro volta sono responsive al TNF- $\alpha$ , ad esempio dalla p38 appartenente alle MAPKs (Baud *et al.* 2001). NF- $\kappa$ B, attivato da TNF- $\alpha$ , può essere presente sottoforma di omodimero o eterodimero, costituito cioè da tre proteine appartenenti alla famiglia di Rel, nello specifico da p50, p65 (o Rel A) e da c-Rel (Poerber JS 2002).



**Fig.5 Modello schematico dell'attivazione di NF-κB.** TNF-α attiva IKK, che a sua volta fosforila IκBα, poi è poliubiquinato e rapidamente degradato dal proteosoma. La degradazione di IκBα determina l'attivazione di NF-κB (p65/p50), che può traslocare nel nucleo, dove regola la trascrizione di geni target, codificanti mediatori infiammatori. (da Karin *et al.* 2000)

## 5. Le chemochine

Le chemochine (*chemotactic cytokines*) sono una famiglia di piccole citochine (8-15 kDa) con proprietà chemoattrattive selettive, che coordinano la circolazione (*trafficking*) omeostatica dei leucociti, ma anche il loro reclutamento (chemiotassi) verso i siti d'infiammazione e danno (Viola *et al.* 2008).

Negli ultimi anni è stato dimostrato il ruolo chiave delle chemochine e dei loro recettori nello sviluppo embrionale, nell'ematopoiesi, nell'angiogenesi, nelle funzioni del sistema immunitario (Feng L. 2000; Gerard *et al.* 2001). La modulazione disregolata del sistema chemochinico è coinvolta nello sviluppo di molte patologie umane, come le malattie autoimmunitarie e infiammatorie croniche, le immunodeficienze e il cancro (Charo *et al.* 2006; Gerard *et al.* 2001). Sono state identificate circa 50 chemochine che hanno una struttura proteica caratterizzata da un motivo conservato contenente cisteine nella porzione N-

terminale (Rotondi *et al.* 2007) e sulla base della conformazione di questo motivo sono state classificate in quattro famiglie (Baggiolini *et al.* 1994): CC, CXC, C e CX3C (dove X rappresenta un qualsiasi aminoacido e C una cisteina).

Della famiglia C fanno parte la limfotattina  $\alpha$  e  $\beta$  (Kelner *et al.* 1994), mentre l'unico membro della famiglia CX3C è la fractalkina (CXC3CL1) (Bazan *et al.* 1999), che ha la particolarità di poter funzionare sia da chemochina, quando è nella forma solubile, sia da molecola di adesione cellulare quando si trova nella forma legata alla membrana.

La divisione strutturale delle chemochine trova corrispondenza nella loro posizione nel genoma. La maggior parte delle chemochine CC sono codificate da un grande gruppo multigenico sul cromosoma 17, mentre la maggior parte delle chemochine CXC sono codificate da due grandi gruppi multigenici sul cromosoma 4 (Yoshie *et al.* 2001). Le chemochine C e CX3C sono codificate da singoli geni localizzati rispettivamente sui cromosomi 1 e 16.

La trasmissione del segnale delle chemochine è mediata attraverso il legame con specifici recettori accoppiati a proteine G a sette domini trans-membrana e a oggi il sistema dei recettori per le chemochine nell'uomo consiste in 20 diversi (Rotondi *et al.* 2007).

Una proprietà caratteristica delle chemochine è la ridondanza, ovvero una singola chemochina può legarsi a recettori diversi e un recettore può legare più chemochine. Questa proprietà riduce ovviamente la specificità di un intervento farmacologico, volto ad attenuare l'infiammazione, che abbia come *target* le chemochine (Kunkel *et al.* 2002).

Le chemochine sono prodotte nel tessuto infiammato non solo dalle cellule immunitarie infiltranti, ma anche dalle cellule residenti nel tessuto (Rotondi *et al.* 2007), in risposta a fattori esogeni ed endogeni, come LPS, virus, autoantigeni e citochine pro-infiammatorie (Liu C. *et al.* 2008) ed in stretta relazione con le fasi del processo infiammatorio. Lo studio delle chemochine nei tessuti dove è presente un processo infiammatorio, potrebbe essere uno strumento utile per comprendere i meccanismi fisiopatologici alla base di questi disordini (Rotondi *et al.* 2007).

## 5.1. Le chemochine e la regolazione del movimento leucocitario

Il reclutamento delle cellule T e di altri leucociti nel sito dell'inflammation è uno step critico per un'efficiente risposta sia a segnali potenzialmente pericolosi sia nella patogenesi delle malattie croniche infiammatorie e nei disturbi immuno-mediati.

Alcune proprietà delle chemochine, come la chemiotassi e la ridondanza, il fatto che differenti recettori chemochinici siano espressi su uno stesso tipo di cellule e che chemochine diverse siano espresse selettivamente in tessuti distinti in seguito a vari tipi di stimoli, permettono una fine regolazione degli infiltrati linfocitari sia negli stati normali, che nelle risposte immunitarie degli stati patologici (Christopherson *et al.* 2001; Zlotnik *et al.* 2000). L'aumento drammatico della secrezione di chemochine durante i processi infiammatori determina un effettivo reclutamento dei leucociti nel tessuto infiammato. L'espressione delle chemochine è stata valutata durante i processi infiammatori in molti organi, come la pelle, il cervello, le articolazioni, le meningi, i polmoni, i vasi sanguigni, i reni ed il tratto gastrointestinale. Sotto appropriato stimolo pro-infiammatorio, molti tipi di cellule, ma non tutti, sono in grado di secernere chemochine. I principali stimoli per la produzione delle chemochine sono le citochine pro-infiammatorie primarie, come IL-1 e TNF- $\alpha$ , prodotti battericidi, come LPS e infezioni virali (Baggiolini *et al.* 1994). Inoltre, IFN- $\gamma$  e IL-4, prodotti rispettivamente da linfociti Th1 e Th2, possono indurre la produzione di chemochine ed anche sinergizzare con IL-1 e TNF- $\alpha$  a stimolare la secrezione di chemochine.

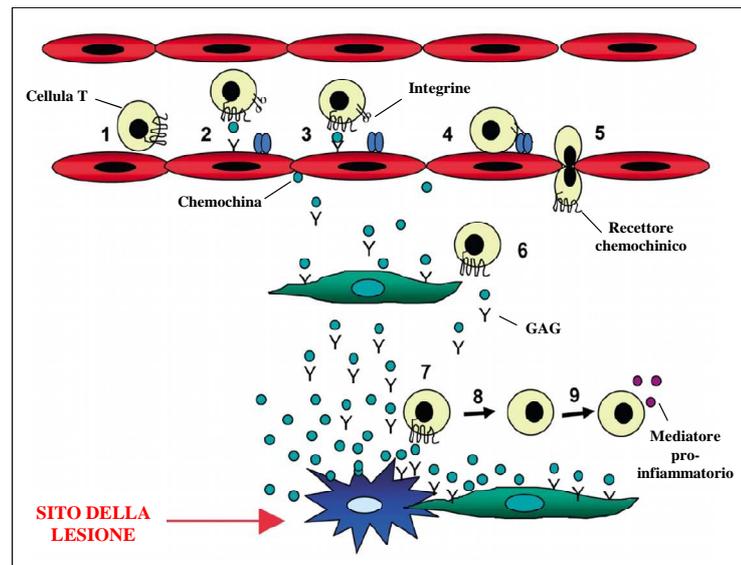
L'immuno-sorveglianza effettiva richiede che il reclutamento e il posizionamento delle cellule immunitarie negli specifici compartimenti tissutali, dove possono eseguire le loro funzioni per assicurare l'immunità (Agace WW. 2006).

Il reclutamento dei leucociti circolanti dal sangue verso i tessuti è un processo molto complesso multisteps, finemente regolato da selectine, integrine e chemochine e coinvolge una serie d'interazioni coordinate tra i leucociti e le cellule endoteliali (Springer TA 1994). Il movimento dei leucociti sulla superficie delle cellule endoteliali (*rolling*) è un processo mediato dalle selectine, le quali

permettono il contatto tra i leucociti e le chemochine, che essendo proteine basiche sono mantenute immobilizzate e concentrate sulla superficie cellulare dai proteoglicani eparan-solfato, formati dai glicosaminoglicani (GAGs) carichi negativamente. Tramite il legame con i propri recettori presenti sui leucociti, le chemochine inducono un *signaling* intracellulare, stimolando un rapido aumento dell'avidità di legame delle integrine e determina la ferma ma transiente adesione dei leucociti all'endotelio e quindi l'extravasazione (Eksteen *et al.* 2008): i leucociti aderenti si muovono attraverso lo strato delle cellule endoteliali e la membrana basale (Muller WA 2003). Dopo aver attraversato la barriera endoteliale, i leucociti perivascolari si muoveranno in risposta al gradiente chemotattico generato dalle chemochine, che permette una precisa localizzazione dei leucociti all'interno del tessuto.

Le chemochine sono secrete nei siti d'infiammazione e d'infezione dalle cellule residenti del tessuto, dai leucociti residenti e reclutati e dalle cellule endoteliali attivate dalle citochine pro-infiammatorie. Le chemochine formano un gradiente di concentrazione nel tessuto circostante lo stimolo infiammatorio che non necessariamente è identico a quello che controlla l'attaccamento dei leucociti alle cellule endoteliali microvascolari. (Muller WA 2003). I leucociti reclutati sono attivati dalle citochine pro-infiammatorie locali e possono essere desensitizzati dalle chemochine, data l'alta concentrazione in loco delle chemochine stesse (Eksteen *et al.* 2008). È chiaro che solo i leucociti in grado di trasmigrare verso un certo sito vascolare sono capaci di rispondere alle chemochine presenti sull'endotelio locale, ovvero le chemochine e i loro recettori sono in grado di determinare la selettività dell'extravasazione leucocitaria (Kunkel *et al.* 2002) (Fig.6).

Le chemochine svolgono, quindi, un ruolo importante per assicurare l'arrivo dei leucociti nei siti delle infiammazioni e delle infezioni, ma, quando sono espresse in modo inappropriato, possono mediare molte patologie autoimmuni e vascolari. Le chemochine quindi sono diventate targets per interventi farmacologici in queste malattie.



**Fig.6 Ruolo delle chemochine nel reclutamento leucocitario durante il processo infiammatorio.** I leucociti, esprimendo i recettori per le chemochine, rotolano (1) e incontrano i loro ligandi sulla superficie dell'endotelio (2). Il legame attiva le integrine (3), determinando la ferma adesione dei leucociti (4). I leucociti escono dai vasi sanguigni per diapedesi (5) e seguono il gradiente chemochinico sui GAGs (6). Nel sito della lesione (7) i recettori chemochinici sono desensitizzati a causa dell'alta concentrazione delle chemochine (8). Le cellule sono attivate a secernere mediatori pro infiammatori (9). (da Kunkel *et al.* 2002)

## 5.2. Le chemochine e la regolazione delle risposte Th1/Th2

Negli ultimi 20 anni, una numerosa serie di dati ottenuti in vitro e in vivo, sia in modelli sperimentali animali che umani, hanno dimostrato che le risposte Th1 e Th2 sono mutualmente regolate: questo processo è noto come *re-direction* o *immune deviation*. Pertanto IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$  non solo favoriscono lo sviluppo delle cellule Th1 ma inibiscono quello delle cellule Th2 (Maggi E. *et al.* 1992; Manetti *et al.* 1993), mentre la presenza di IL-4 inibisce lo sviluppo delle cellule Th1 e provoca uno *shift* della risposta Th1 verso un fenotipo meno polarizzato (Ghoreschi *et al.* 2003).

È stato dimostrato il coinvolgimento delle chemochine nella regolazione delle risposte Th1/Th2. Le chemochine esercitano la loro attività chemotattica anche verso i linfociti Th1 e Th2 (Zlotnik *et al.* 2000) e generalmente, il reclutamento

selettivo delle cellule Th1 nel tessuto infiammato esclude, in genere, quello delle cellule Th2 e viceversa. Alcune chemochine sembrano in grado di influenzare la polarizzazione delle risposte Th1 o Th2 interagendo direttamente con i recettori chemochinici presenti sulle cellule stesse e/o favorendo la produzione delle citochine specifiche Th1 o Th2.

Sono stati descritti vari recettori per le chemochine associati con i linfociti: CCR5 e CXCR3 sono stati associati con il fenotipo Th1, mentre CCR3, CCR4 e CCR8 con il fenotipo Th2. L'espressione di questi recettori può cambiare a seconda dello stato di attivazione delle cellule T, ad esempio, CCR8 è fortemente espresso solo dalle cellule Th2 attivate (Pease *et al.* 2006).

Inoltre, le chemochine CCL3 (MIP1 $\alpha$ ) e CCL2 (MCP-1) sono in grado di indurre il differenziamento delle cellule Th1 e Th2. Le cellule T naïve di topi CCL3<sup>-/-</sup> o CCL2<sup>-/-</sup>, quando incubate con CCL3, mostrano un'aumentata produzione di IFN- $\gamma$ , mentre l'incubazione delle stesse cellule con CCL2 determina un aumento della produzione di IL-4 (Karpus *et al.* 1997).

Recentemente, è stato dimostrato che la chemochina CXCL10 promuove la produzione di citochine Th1 e inibisce la produzione di citochine Th2, mentre CXCL4 ha un'azione opposta (Romagnani P. *et al.* 2005): quest'effetto è dovuto alla rispettiva interazione di CCL10 con CXCR3 e di CXCL4 con CXCR3-B, le due varianti di CXCR3 che sono entrambe molto espresse dai linfociti T umani (Lasagni *et al.* 2003).

### **5.3. Le chemochine-CXC indotte dall'IFN- $\gamma$ ed il recettore CXCR3**

Le CXC chemochine hanno quattro cisteine conservate e sono distinte dalla presenza di un singolo residuo aminoacidico tra la prima e la seconda cisteina. La sottofamiglia delle CXC chemochine comprende 14 diversi membri.

Molti membri delle CXC chemochine non solo hanno proprietà chemotattiche verso i neutrofili e i linfociti, ma mostrano anche un'attività positiva o negativa nel controllo dell'angiogenesi (Romagnani P. *et al.* 2004).

Le CXC chemochine possono essere suddivise in base alla loro struttura in due classi in base alla presenza o assenza di una sequenza ELR (motivo tripeptidico: Glu-Leu-Arg) nella regione N-terminale. La presenza o l'assenza del motivo ELR sembra essere correlata rispettivamente all'attività angiogenica o a quell'angiostatica (Strieter *et al.* 1995). Pertanto, le chemochine-CXC ELR+ svolgono un ruolo nei processi angiogenetici (Bikfalvi A. 2004), mentre quelle ELR-, come CXCL4, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, antagonizzano l'angiogenesi (Romagnani P. *et al.* 2004).

Inoltre, le CXC chemochine ELR-, come CXCL13, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, sono potenti chemoattrattori per i linfociti, mentre quelle ELR+, come IL-8, GCP-2 per i neutrofili (Hebert *et al.* 1991).

Sulla base della loro funzione e della loro espressione, è possibile classificare le chemochine in due gruppi:

- *infiammatorie/inducibili*: sono prodotte da cellule attivate e sono regolate da stimoli pro-infiammatori, come LPS e citochine primarie (es. IL-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ); orchestrano le risposte dell'immunità innata e adattativa, controllando il reclutamento dei leucociti effettori nei siti delle infezioni e dell'infiammazione, nei tessuti danneggiati e nei tumori.
- *omeostatiche/costitutive*: sono prodotte costitutivamente e coinvolte nel mantenimento del *trafficking* dei linfociti e delle DCs durante l'ematopoiesi e le fasi iniziali della risposta adattativa nella milza e nei linfonodi e nella sorveglianza immunologica in tessuti periferici sani (Rot *et al.* 2004)

Questa distinzione risulta essere una classificazione artificiosa in quanto studi recenti definiscono chemochine "*dual function*", ovvero che appartengono a entrambi i gruppi e che quindi non possono essere classificate in nessuno dei due gruppi funzionali (Moser *et al.* 2004).

Il ruolo delle chemochine CXC in molti tipi di disordini infiammatori e autoimmuni è stato ampiamente studiato (Charo *et al.* 2006) e molte evidenze suggeriscono che un sottogruppo di questa famiglia di chemochine, che si lega a uno stesso recettore, CXCR3, giochi un ruolo importante nella patogenesi delle malattie autoimmuni e in particolare di quelle endocrine.

Alla famiglia delle CXC appartengono delle chemochine che condividono la proprietà di essere inducibili dall'IFN- $\gamma$ :

- CXCL10 o IP-10 (*IFN-  $\gamma$ -Inducible Protein 10 kDa*) (Luster *et al.* 1985)
- CXCL9 o Mig (*Monokine induced by IFN- $\gamma$* ) (Farber *et al.* 1990)
- CXCL11 o I-TAC (*IFN-  $\gamma$  Inducible T cell  $\alpha$ -Chemoattractant*) (Cole *et al.* 1998).

Tutte e tre si legano a unico recettore, chiamato CXCR3, scoperto nel 1995, ma con diversa affinità di legame (CXCL11 > CXCL10 > CXCL9). Inizialmente il recettore CXCR3 è stato trovato espresso sui linfociti B, sulle cellule NK e su linfociti T, in particolare nella sottopopolazione Th1 (Bonicchi *et al.* 1998). In studi successivi è stato osservato che CXCR3 non è espresso solo sulle cellule immunitarie ma anche da cellule residenti quali cellule mesangiali umane (Romagnani P. *et al.* 1999), periciti vascolari (Bonacchi *et al.* 2001), cellule endoteliali umane da microcircolo (Romagnani P. *et al.* 2001).

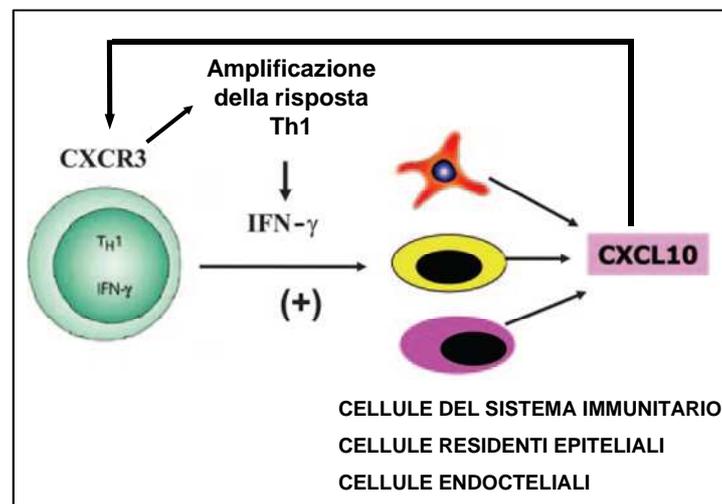
Recentemente è stato identificato un nuovo recettore chiamato CXCR3-B, che deriva da uno *splicing* alternativo del gene di CXCR3 (Lasagni *et al.* 2003). CXCR3-B, recettore esclusivo per la chemochina CXCL4, lega anche CXCL10, CXCL9 e CXCL11. L'interazione delle chemochine con CXCR3 media gli effetti chemotattici ed immunitari, mentre il legame con CXCR3-B determina gli effetti angiostatici.

Molte evidenze sperimentali hanno dimostrato il ruolo di CXCL10 nell'iniziare e nell'amplificare le allorisposte dell'ospite (Hancock *et al.* 2001). In particolare, studi recenti hanno valutato con l'utilizzo di topi *knockout* e di anticorpi monoclonali neutralizzanti gli effetti della modulazione di vari *pathways* chemochina/recettore ed hanno dimostrato che l'asse CXCL10/CXCR3 è il più importante nel rigetto acuto di trapianto cardiaco (Hancock *et al.* 2000; Hancock *et al.* 2001). Inoltre, topi deficienti per CXCL10 presentano la risposta delle cellule T compromessa, infiltrati infiammatori limitati e non riescono a controllare le infezioni virali (Dufour *et al.* 2002). L'espressione di CXCL10 e di CXCR3 nell'organo trapiantato è associata con il rigetto d'organo di rene (Segeer *et al.* 2001), di polmone (Agostini *et al.* 2001) e di cuore (Melter *et al.* 2001).

CXCL10 e il suo recettore CXCR3 non solo mediano il reclutamento leucocitario,

ma guidano anche la proliferazione verso stimoli allogenici e antigenici delle cellule T, che in risposta a cambiamenti antigenici secernono IFN- $\gamma$  (Campbell JD. *et al.* 2004).

CXCL10 up-regola la produzione delle citochine Th1 e down-regola quella delle citochine Th2 (Romagnani P. *et al.* 2005), determinando una forte upregolazione della reazione infiammatoria caratterizzata dalla produzione da parte delle cellule di tipo Th1 di IFN- $\gamma$ , che esercita un ruolo protettivo importante verso le infezioni dovute a batteri intracellulari e alcuni virus. Inoltre, CXCL10 determina un down-regolazione dell'infiammazione allergica sostenuta dalle risposte Th2.



**Fig.7 Ruolo delle interazioni CXCL10/CXCR3 nell'amplificazione delle risposte immunitarie di tipo Th1.** CXCL9, CXCL10 e CXCL11 agiscono come potenti fattori chemotattici nel reclutamento delle cellule Th1 nei tessuti infiammati e sono selettivi costimolatori della produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule T in risposta agli antigeni. Poiché i ligandi di CXCR3 sono prodotti dai monociti, dalle cellule endoteliali e da quelle epiteliali residenti in risposta all'IFN- $\gamma$ , le chemochine che legano CXCR3 e l'IFN- $\gamma$  prodotto dai linfociti T CD4+ hanno la capacità di creare un loop citochina/chemochina a feedback positivo che amplifica le risposte immunitarie di tipo Th1 (da Rotondi *et al.* 2007).

Quando una risposta autoimmune si sviluppa, le citochine Th1, compreso l'IFN- $\gamma$ , inducono l'espressione di CXCR3 sui linfociti e le DCs negli organi linfoidi. Queste cellule appena acquistano la capacità, migrano verso le chemochine infiammatorie (CXCL9, CXCL10 e CXCL11), prodotte dalle cellule residenti (come i fibroblasti, le cellule epiteliali...). Queste cellule e in particolare i linfociti

Th1, una volta reclutate dal sangue negli organi infiammati, stimolano le cellule residenti ad aumentare la produzione di chemochine attraverso la secrezione di IFN- $\gamma$ . Si crea, quindi, un loop d'amplificazione che sostiene il processo infiammatorio nelle malattie autoimmuni (Lacotte *et al.* 2009) (Fig. 7).

#### **5.4. Le chemochine nelle malattie autoimmuni**

Considerando che le malattie autoimmuni sono caratterizzate da un'infiltrazione linfocitaria nell'organo target e che le chemochine svolgono un ruolo importante nell'orchestrare il movimento dei leucociti, molti sono gli studi su modelli animali e umani che rivolgono l'attenzione al ruolo delle chemochine nell'autoimmunità (Kimura *et al.* 2007).

Molte evidenze sperimentali hanno messo in luce come il complesso network delle chemochine risulti disregolato nelle malattie autoimmuni, sebbene ancora molti altri studi siano necessari per delineare al meglio questi meccanismi (Lacotte *et al.* 2009).

Studi con topi *knockout* hanno mostrato che la mancanza di un gene codificante per una chemochina o un recettore chemochinico può prevenire lo sviluppo o attenuare la progressione della malattia. Questi studi suggeriscono un ruolo di CCR2 e CX3CR1 nell'aterosclerosi (Boring *et al.* 1998) e di CCR1 e CCR2 nell'encefalomielite allergica sperimentale (*experimental allergic encephalomyelitis*, EAE) (Proudfoot AE. 2002). Nel topo diabetico non-obeso (*non-obese diabetic*, NOD), la mancanza di CCL3 è associata con la riduzione di insulite distruttiva e la protezione dal diabete spontaneo (Cameron *et al.* 2000).

Nella sclerosi multipla le chemochine sono coinvolte nello sviluppo della malattia (Ubogu *et al.* 2006) e in particolare CCL2 nel modello murino di EAE correla con lo stato clinico della malattia (Huang *et al.* 2001). Nell'artrite reumatoide, i trattamenti basati sull'uso di anticorpi anti-chemochine o di antagonisti dei recettori chemochinici hanno migliorato la severità della malattia (Szekanecz *et al.* 2006). Nel diabete mellito di tipo I, le chemochine indotte dall'IFN- $\gamma$  (CXCL9 e CXCL10) espresse dalle cellule  $\beta$  sono responsabili del reclutamento dei

linfociti T CXCR3+ nelle isole pancreatiche (Frigerio *et al.* 2002).

Tra tutte le chemochine e i loro recettori, CXCR3 e le chemochine leganti CXCR3 sembrano giocare un ruolo chiave nel mantenimento e nell'amplificazione dei processi infiammatori correlati all'autoimmunità (Wijtmans *et al.* 2008).

## **6. La malattia di Graves**

Le malattie autoimmuni della tiroide (*autoimmune thyroid disorders*, AITD) sono i disordini autoimmuni organo-specifici più comuni, che colpiscono circa il 5% della popolazione (Rotondi *et al.* 2007).

Nell'uomo le AITD sono caratterizzate da reattività verso antigeni self-tiroidei, che può essere espressa come infiammazione distruttiva o autoimmunità anti-recettore e comprende lo spettro clinico della malattia di Graves (*Graves' Disease*, GD) e della tiroidite autoimmune cronica (*chronic autoimmune thyroiditis*, CAT) (Weetman AP. 2000).

La malattia di Graves, descritta per la prima volta da Robert Graves nel 1835, è caratterizzata dalla produzione d'auto-anticorpi, detti TRAb (*thyrotropin receptor antibody*), che si legano al TSHR, recettore per la tirotropina (TSH), stimolando non solo la sintesi e la secrezione di ormoni tiroidei, ma anche ipertrofia ed iperplasia follicolare, provocando l'aumento di volume della tiroide (Weetman AP. 2000). Colpisce circa lo 0.5% della popolazione e costituisce la causa del 50-80% dei casi d'ipertiroidismo (Cooper DS. 2003). La malattia è più frequente nel sesso femminile, con un rapporto femmine-maschi pari a 5-10:1, ha una prevalenza del 2.5-3% e compare più spesso intorno alla terza-quarta decade di vita (Romagnani S. *et al.* 2000).

La malattia è associata a sintomi direttamente correlati all'eccesso d'ormoni tiroidei, come gozzo diffuso, ipertiroidismo ed esoftalmo. Inoltre, alcuni pazienti con GD sviluppano manifestazioni in regioni localizzate del sistema del tessuto connettivo, come l'oftalmopatia di Graves (*Graves' ophthalmopathy*, GO) e la dermopatia (Prabhakar *et al.* 2003). Sono anche presenti auto-anticorpi contro la tireoglobulina (Tg) e la perossidasi tiroidea (TPO), caratteristici di tutti i tipi di

AITD e la presenza di questi anticorpi nel siero, l'aumento dei livelli di T4 e T3, la riduzione del TSH e la presenza di GO all'esame clinico permettono di distinguere questa patologia da altre cause di ipertiroidismo e gozzo diffuso (Weetman AP. 2000).

GD presenta specifiche caratteristiche istopatologiche della tiroide: ipertrofia e iperplasia del parenchima, cambiamento da cuboidale a colonnare dell'epitelio tiroideo, aumento della vascolarizzazione, infiltrato di linfociti e plasmacellule; inoltre le cellule epiteliali mostrano l'apparato del Golgi allargato, un aumento del numero di mitocondri e la vacuolizzazione del colloide (Prabhakar *et al.* 2003).

Come altre malattie autoimmuni, GD è causato da una combinazione di fattori genetici e ambientali che possono determinare anche la prognosi a lungo termine del disordine. In particolare, la presenza dell'antigene HLA-DR3 conferisce un rischio relativo di sviluppare la malattia 3.8 superiore rispetto alla popolazione che non possiede tale antigene (Romanani S. *et al.* 2000; Weetman AP. 2009). Spesso la malattia può fluttuare nell'attività ed occasionalmente possono divenire eutiroidei in modo spontaneo.

### **6.1. Patogenesi e progressione: l'asse CXCL10/CXCR3**

La malattia di Graves è caratterizzata da infiltrazione cellulare, costituita da cellule mononucleate (linfociti T, linfociti B e macrofagi) (Weetman AP. 2004), diffusa della ghiandola, che è un importante sito per la sintesi di autoanticorpi (Volpe R. 1991) e che può risultare nella distruzione del tessuto (Rapoport *et al.* 2001; Weetman AP 2000).

Quando la tolleranza verso gli antigeni tiroidei è rotta, le cellule endoteliali delle venule post-capillari si attivano e permettono l'extravasazione dei leucociti del sangue (Marazuela *et al.* 1994). I linfociti sono effettori del danno tissutale e sono coinvolti nell'induzione delle risposte autoimmuni, mediando importanti effetti infiammatori, come la produzione e il rilascio di citochine (Marrack *et al.* 2001).

La tipologia dell'infiltrato varia con il tipo di AITD, la durata della malattia, la terapia utilizzata e inoltre è paziente-dipendente.

GD è caratterizzato da un infiltrato persistente della ghiandola tiroidea composto principalmente da linfociti CD4+ e CD8+ (Weetman AP. 2004); le cellule CD4+ sono maggiormente presenti a livello degli aggregati linfatici mentre le cellule CD8+ sono soprattutto distribuite tra i follicoli tiroidei (Romagnani S. *et al.* 2000).

Per lungo tempo, GD è stata considerata come una malattia autoimmune Th2-dominante in quanto mediato dai TRAb. Nagayama *et al.* (Nagayama *et al.* 2003), tramite un particolare modello murino hanno potuto effettuare l'analisi in vitro ed in vivo del paradigma Th1/Th2 nel GD. I topi, iniettati con un adenovirus codificante per il TSHR in modo da indurre TRAb e ipertiroidismo, mostravano uno *shift* immunologico verso il fenotipo Th2, che era accompagnato da una diminuzione nella produzione di TRAb, suggerendo, invece, che una risposta di tipo Th1 verso i TSHR è associata con l'induzione della malattia.

Inoltre nell'uomo, i TRAb sono principalmente immunoglobuline G1 (IgG1), una sottoclasse di tipo Th1 (McLachlan *et al.* 2005). La classificazione del GD come malattia tipicamente Th1 è stata molto dibattuta; recentemente Romagnani *et al.* (Romagnani P. *et al.* 2002b) hanno dimostrato che nelle ghiandole di pazienti alle fasi iniziali della malattia si ha il reclutamento di linfociti Th1 esprimenti CXCR3 e l'espressione del ligando corrispondente (CXCL10), suggerendo una dominanza Th1 piuttosto che Th2. Perciò, l'ipotesi che GD sia una patologia guidata dal Th2 è cominciata a diventare molto controversa.

Nel 2007, Inukai *et al.* (Inukai *et al.* 2007) hanno fatto uno studio longitudinale per determinare il bilancio Th1/Th2 durante il corso clinico di pazienti con GD, valutando sia l'espressione dei recettori chemochinici sui linfociti del sangue periferico, sia le concentrazioni plasmatiche dei rispettivi ligandi, dopo trattamento antitiroideo con il metimazolo (MMI). È stata valutata l'espressione di CXCR3 e la concentrazione nel plasma di CXCL10, chemochina associata a una risposta di tipo Th1 e l'espressione di CCR4 e del suo ligando TARC (*Thymus and Activation-Regulated Chemokine*), associati a una risposta Th2. Hanno dimostrato che le cellule Th1 erano predominanti rispetto alle Th2 nei pazienti ipertiroidici in fase attiva di GD, suggerendo una dominanza Th1 è responsabile dell'induzione della malattia. Inoltre dopo trattamento con MMI le cellule

esprimenti CXCR3 e le concentrazioni plasmatiche di CXCL10 diminuivano, mentre le cellule esprimenti CCR4 dopo 24 settimane di trattamento con MMI aumentavano significativamente. E inoltre il rapporto CXCR3/CCR4, indicante il bilancio Th1/Th2, mostrava una diminuzione significativa dopo il trattamento di MMI rispetto al basale. Il gruppo di Inukai ha perciò dimostrato come una progressiva e graduale transizione da dominanza Th1 a Th2 avviene durante il decorso clinico del GD sotto trattamento con MMI.

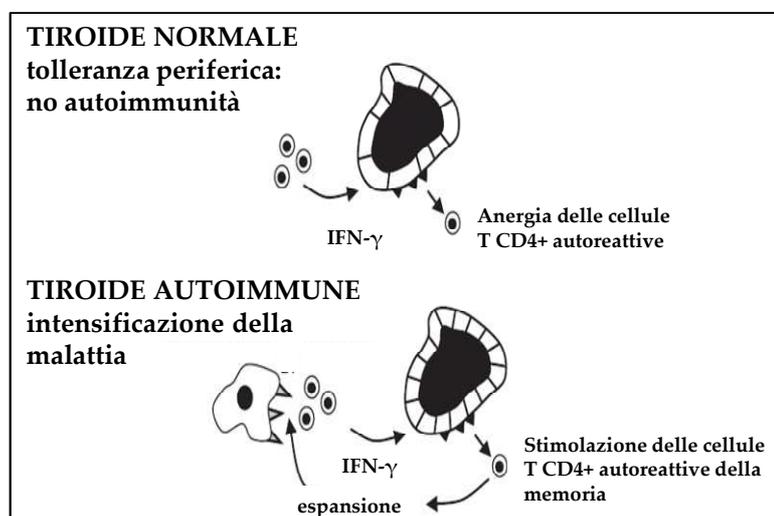
Il reclutamento dei linfociti nelle AIDT è un processo multisteps che prevede diverse tappe: aderenza e migrazione attraverso l'endotelio, *trafficking* attraverso l'interstizio e movimento verso le cellule follicolari tiroidee (*thyroid follicular cell*, TFC) (Springer TA. 1994). L'extravasazione leucocitaria coinvolge l'azione combinata di molecole di adesione, come selectine e integrine e di fattori chemotattici, in particolare di chemochine.

Dato il ruolo importante svolto dalle chemochine nel promuovere e mantenere i processi autoimmuni, molti studi sono stati effettuati per chiarire le relazioni tra chemochine e AIDT. Nelle AIDT è stata dimostrata la produzione da parte delle cellule T infiltranti e dei macrofagi di citochine, come IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Margolick *et al.* 1988; Rutenfranz *et al.* 1992; Weetman *et al.* 1997). Anche le TFC sono in grado di produrre loro stesse molte citochine e chemochine (Miyazaki *et al.* 1989; Watson *et al.* 1995; Zheng *et al.* 1991).

Le interazioni tra TFC e linfociti sono cruciali nel determinare la progressione delle AIDT. Le TFC di pazienti affetti da AITD esprimono sulla superficie cellulare molecole MHC di classe II e possono funzionare da *thyroid autoantigen presenting cells*, capaci di indurre anergia nelle cellule T naïve in condizioni normali, oppure di iniziare o perpetuare le AIDT, stimolando le cellule T della memoria a determinare l'espansione dell'infiltrato una volta che l'AIDT si è stabilizzata (Weetman AP. 2003) (Fig.8).

L'induzione di molecole MHC di classe II sulle TFC è dipendente dal rilascio di IFN- $\gamma$  da parte dell'infiltrato linfocitario. In risposta a IFN- $\gamma$  ed ad altre citochine, come IL-1 e TNF- $\alpha$ , le TFC stesse secernono una serie di citochine e chemochine che sono in grado di facilitare la localizzazione dell'infiltrato nella ghiandola tiroidea (Armengol *et al.* 2003; Kemp *et al.* 2003). Altri mediatori pro-

infiammatori solubili rilasciati dalle TFC includono i metabolici reattivi dell'ossigeno, le prostaglandine e il nitrossido (Kasai *et al.* 1996).



**Fig.8. Effetto dell'espressione degli antigeni MHC di classe II sui tireociti.** Nello stato normale, l'espressione transiente degli antigeni di classe II sui tireociti induce lo stato di tolleranza periferica in cellule potenzialmente autoreattive, ad esempio durante le tiroiditi virali. Nell'autoimmunità, le cellule T CD4+ vanno in contro ad anergia e sono presenti le cellule T della memoria, che proliferano in risposta ai tireociti esprimenti antigeni di classe II e presentanti autoantigeni positivi, perpetuando il processo autoimmunitario. (da Weetman AP. 2003)

La capacità di TFC umane in coltura di produrre chemochine è stata descritta per la prima volta da Weetman *et al.* (Weetman *et al.* 1992) che hanno dimostrato che i tireociti esprimevano IL-8, chemochina CXC, quando stimolati con IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ . Inoltre, è stato dimostrato come le cellule follicolari tiroidee producono MCP-1 (Kasai *et al.* 1996) e RANTES (García-López *et al.* 2001) in risposta al TNF- $\alpha$ . Recentemente, gli studi sulle chemochine coinvolte nel GD si sono focalizzati sulle chemochine indotte dall'IFN- $\gamma$ , come CXCL10 e CXCL9. García-López *et al.* (García-López *et al.* 2001) hanno dimostrato che i tireociti umani in coltura primaria secernono le chemochine leganti CXCR3 in seguito a trattamento con IFN- $\gamma$ : in particolare, in condizioni basali CXCL10 e CXCL9 non sono misurabili nel surnatante delle TFC umane, ma la loro secrezione viene indotta da IFN- $\gamma$  e sinergicamente aumentata dall'aggiunta di TNF- $\alpha$ .

I linfociti infiltranti la tiroide derivanti da pazienti affetti da AITD, rispetto ai PBMCs autologhi, mostrano una più alta espressione di CXCR3 e di CCR2 e

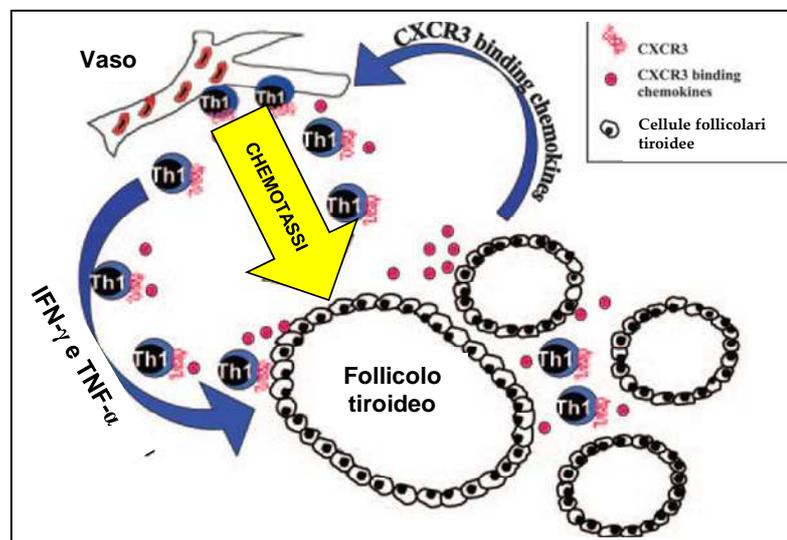
CCR5, rispettivamente recettori di CCL2 e CCL5. In particolare, i linfoblasti T esprimenti CXCR3 mostrano una più alta capacità migratoria nei supernatanti di cellule tiroidee follicolari stimulate con IFN- $\gamma$ , capacità che viene abolita da anticorpi neutralizzanti diretti verso CXCL10 e CXCL9 ed il loro recettore. Considerando tutti questi dati, è stato suggerito un ruolo delle cellule follicolari tiroidee nel reclutamento di specifici *subsets* di linfociti attivati attraverso la produzione delle chemochine CXCL10, CXCL9 e CCL5 (García-López *et al.* 2001). Inoltre, è stato riportato un aumento statisticamente significativo dell'espressione di CXCL10 e CXCL9 nei tessuti di pazienti affetti da GD e da tiroidite di Hashimoto rispetto a tessuti di tiroide normale (García-López *et al.* 2001). L'espressione dell'mRNA di CXCL10, di CXCL9 e del loro recettore CXCR3 nelle tiroidi normali e nelle ghiandole di pazienti con ipertiroidismo autoimmune e non (GD e adenoma tossico) è stato misurato utilizzando l'ibridazione *in situ* da Romagnani *et al.* (Romagnani P. *et al.* 2002b), dimostrando in modo chiaro che CXCL10, CXCL9 e CXCR3 sono iperesprese nelle ghiandole di pazienti affetti da Graves. La grande variabilità nell'espressione delle chemochine riportata da García-López *et al.* (García-López *et al.* 2001) nel GD è stata confermata e correlata alla durata della malattia. Un aumento significativo dell'espressione di CXCL10 è risultato evidente nelle tiroidi di pazienti con *recent onset* (<2 anni) rispetto a quelli *long-standing* (>2 anni), in cui l'espressione non differisce da quella osservata nelle tiroidi normali (Romagnani P. *et al.* 2002b). Inoltre l'espressione dell'mRNA di CXCL10 e CXCL9 è risultata strettamente correlata con quella di IFN- $\gamma$ , rilevabile negli stessi tessuti tiroidei. Inoltre con la tecnica dell'immunoistochimica *multiple double-label* sono state identificate le fonti cellulari delle CXCR3-binding chemochine: CXCL10 e CXCL9 sono risultate altamente espresse sia dalle cellule mononucleari infiltrati la tiroide (linfociti T e macrofagi) ma anche dalle TFC; mentre il recettore CXCR3 è stato trovato solo sulle cellule infiammatorie ed epiteliali (Romagnani P. *et al.* 2002b).

Almeno per il CXCL10, il gruppo di Antonelli (Antonelli *et al.* 2006b; Antonelli *et al.* 2007) ha dimostrato che, in pazienti di GD, la tiroide è la principale fonte di chemochina circolante, in quanto la normalizzazione del CXCL10 si ottiene dopo

la tiroidectomia o l'ablazione del tessuto tiroideo in seguito a trattamento con iodio radioattivo.

Tutti questi dati suggeriscono un possibile ruolo patogenetico delle chemochine CXCL10 e CXCL9 nel promuovere GD ed un ruolo fondamentale delle cellule follicolari epiteliali residenti nel reclutamento delle cellule infiltranti e nell'amplificazione dell'infiammazione della ghiandola tiroidea.

È stato dimostrato che CXCL10, prodotta dalle cellule residenti nel tessuto infiammato guida la chemiotassi dai vasi sanguigni delle cellule T esprimenti CXCR3. Questo particolare subset cellulare mostra un fenotipo immunologico a prevalenza Th1 e produce IFN- $\gamma$ , che stimolando la produzione di chemochine ed in particolare CXCL10, da parte delle cellule follicolari, così da perpetuare il processo infiammatorio (Fig.9). Questo loop d'eventi supporta il ruolo attivo giocato dalle cellule follicolari tiroidee ed in generale dalle cellule dell'epitelio ghiandolare nel determinare la specificità dei linfociti infiltranti e nel mantenere il processo autoimmune (Rotondi *et al.* 2007).



**Fig.9** Rappresentazione schematica del meccanismo di reclutamento linfocitario guidato dalle chemochine leganti CXCR3 nell'autoimmunità endocrina. (da Rotondi *et al.* 2007)

## 6.2. I livelli sierici di CXCL10 nella malattia di Graves

L'aumento della produzione di chemochine nei tessuti infiammati ed il relativo flusso sanguigno del distretto dell'infiammazione sono responsabili dell'incremento della concentrazione delle chemochine stesse nel siero e negli altri fluidi biologici. È perciò ragionabile pensare che la misurazione delle chemochine nei fluidi biologici possa essere uno strumento utile per monitorare la fase e la severità della malattia (Rotondi *et al.* 2007).

Le chemochine CXC indotte dall'IFN- $\gamma$  (CXCL9, CXCL10, CXCL11) sono associate ad una risposta immunitaria di tipo Th1-mediata. Tra loro, CXCL10 è la prototipica ed i livelli sierici di CXCL10 sono aumentati in diverse condizioni endocrine di tipo autoimmune, come il diabete di tipo I (Shimada *et al.* 2001; Nicoletti *et al.* 2002), le tiroiditi autoimmuni (Antonelli *et al.* 2004; Antonelli *et al.* 2005) ed anche la malattia di Graves (Romagnani P. *et al.* 2002b).

La prima osservazione di un aumento dei livelli sierici di CXCL10 in pazienti con GD rispetto a soggetti sani è stata riportata dal gruppo di Romagnani *et al.* (Romagnani P. *et al.* 2002b), che ha anche trovato una correlazione inversa tra le concentrazioni di CXCL10 nel siero e la durata di GD: livelli più alti di CXCL10 sono stati ritrovati nei pazienti con *recent-onset* (< 2 anni), ovvero durante la fase attiva della malattia. Al contrario, non è stata dimostrata nessuna relazione tra i livelli sierici di CXCL10 ed altri parametri biochimici, come sesso, età e la quantità degli anticorpi Tg Ab, TPO Ab, o TR Ab circolanti. Inoltre la riduzione dei livelli sierici di CXCL10 in *long-standing* (> 2 anni) GD è associata con un aumento nel siero della concentrazione di CCL22, chemochina associata con le risposte immunitarie di tipo Th2 (Bonecchi *et al.* 1998; Romagnani P. *et al.* 2002b), indicando che la risposta Th potrebbe spostarsi verso un altro tipo in accordo con i cambiamenti del corso della malattia.

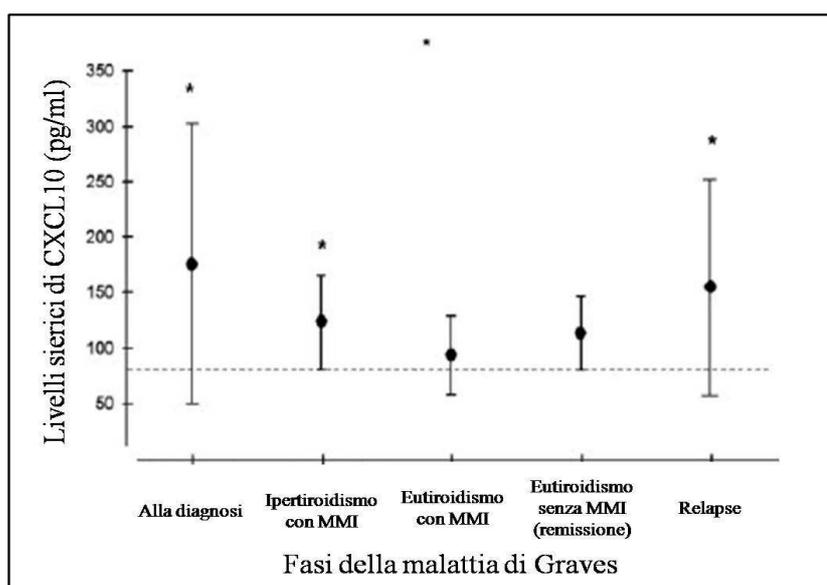
In uno studio retrospettivo, Antonelli *et al.* (Antonelli *et al.* 2006c) hanno confermato l'aumento dei livelli sierici di CXCL10 nei pazienti di GD, associato con la fase attiva ipertiroidea della malattia ed hanno illustrato una diminuzione rilevante di CXCL10 quando l'eutiroidismo viene restaurato con il trattamento

con MMI, farmaco correntemente utilizzato nella terapia antitiroidea.

Alti livelli sierici di CXCL10 e CCL17 sono stati ritrovati recentemente da Aso *et al.* (Aso *et al.* 2006; Inukai *et al.* 2007) nei pazienti di GD complicati con diabete di tipo I.

Per comprendere meglio il significato di CXCL10 circolante nel GD e per determinare se l'ipertiroidismo di *per sé* è responsabile degli alti livelli di CXCL10 nel sangue, pazienti ipertiroidei con GD o con gozzo nodulare tossico sono stati arruolati in uno studio di tipo prospettivo dal gruppo di Antonelli nel 2006 (Antonelli *et al.* 2006a). I livelli sierici di CXCL10 sono stati valutati nei pazienti ipertiroidei affetti da GD al momento della diagnosi e dopo 3 mesi di trattamento con MMI. È stato trovato che i livelli sierici di CXCL10 basali erano significativamente più bassi nei pazienti affetti da gozzo multinodulare tossico (ovvero da un aumento di volume della tiroide, caratterizzato dalla presenza più noduli e associato ad ipertiroidismo da produzione in eccesso di ormoni) rispetto ai GD, malgrado un accurato *matching* per T3 e T4 sierici liberi. Un significativo abbassamento dei livelli della chemochina nel siero si aveva nei pazienti GD dopo restaurazione dell'eutiroidismo con MMI, mentre i pazienti con gozzo nodulare tossico mostravano solamente una leggera, ma non significativa riduzione del CXCL10 circolante, quando resi eutiroidi con il medesimo trattamento farmacologico. Con questo studio è stato quindi dimostrato che non è l'ipertiroidismo di *per sé*, ma piuttosto l'evento autoimmune ad essere responsabile dell'aumento dei livelli sierici delle chemochine, almeno per CXCL10.

In relazione con la fase clinica della malattia di Graves, sono state osservate significative differenze nei livelli sierici di CXCL10 (Antonelli *et al.* 2006c) a GD in fase onset della malattia ed in fase di *relapse* dell'ipertiroidismo dopo il trattamento con farmaci antitiroidei (Fig.10). In generale, i pazienti che hanno una fase attiva della malattia presentano nel sangue i livelli più alti della chemochina rispetto ai soggetti di controllo (Rotondi, *et al.* 2007).



**Fig.10 Rappresentazione grafica dei livelli sierici medi di CXCL10 misurati in pazienti di GD a differenti stadi della malattia.** \* significatività statistica verso i livelli sierici di CXCL10 di pazienti sani (*linea tratteggiata*). (da Rotondi *et al.* 2007)

Studi recenti hanno dimostrato che livelli sierici elevati di CXCL10 pre-trapianto sono uno strumento clinico utile per l'identificazione dei soggetti ad alto rischio di rigetto acuto o di nefropatia cronica del trapianto e quindi perdita dell'organo, suggerendo che possono essere utilizzati per l'identificazione dei pazienti che necessitano una più aggressiva terapia immunosoppressiva post-trapianto (Lazzeri *et al.* 2005b).

In accordo con queste dimostrazioni, la misurazione del CXCL10 nel siero, al momento della diagnosi d'ipertiroidismo, può essere un *marker* utile per identificare varianti di GD più severe e aggressive, per la scelta del trattamento terapeutico più appropriato (farmacologico, tiroidectomia o radioiodio) e per predire eventuali *relapse* (Rotondi, *et al.* 2007).

## 7. Il trattamento farmacologico della malattia di Graves

Recentemente lo sviluppo di strategie farmacologiche finalizzato ad attenuare i processi infiammatori senza indurre un'immunosoppressione generalizzata, si è

focalizzato verso le chemochine. Da quando la famiglia delle chemochine è stata scoperta, con molti approcci sperimentali si è cercato di bloccare in modo selettivo il reclutamento dei leucociti verso il sito dell'infiammazione. La comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie autoimmuni endocrine, ovvero il ruolo attivo giocato dalle cellule epiteliali endocrine, attraverso la produzione delle chemochine indotte dall'IFN- $\gamma$ , nel reclutamento di specifici *subsets* dei linfociti nella ghiandola danneggiata, suggerisce nuovi approcci immunoterapici diretti a colpire l'attivazione ed il *trafficking* leucocitario ed ad indurre anergia dei linfociti.

È cresciuto quindi l'interesse per il trattamento del GD verso nuove strategie terapeutiche in grado di interrompere le interazioni tra le chemochine ed i loro recettori (Rotondi, *et al.* 2007).

### **7.1. I farmaci antitiroidei: metimazolo**

L'approccio terapeutico all'ipertiroidismo nel GD consiste nel cercare un rapido miglioramento dei sintomi con un farmaco beta-bloccante e nel cercare di diminuire la sintesi degli ormoni tiroidei con la somministrazione di farmaci antitiroidei, con l'ablazione con iodio radioattivo oppure con la chirurgia.

I principali farmaci antitiroidei (*antithyroid drugs*, ATD) utilizzati nel management dell'ipertiroidismo nel GD sono le tionamidi. Le tionamidi includono il propiltiouracile (6-propyl-2-thiouracil, PTU), il metimazolo (1-methyl-2-mercaptoimidazole, MMI: Tapazole) ed il carbimazolo (Carbexoxymethimazole CMI). Il CMI è il pro-farmaco del MMI, in cui è rapidamente convertito e può essere considerato equivalente ad esso (Bartalena *et al.* 2005) (Fig.11).

Il MMI è il farmaco antitiroideo d'elezione, perché ha una durata d'azione più lunga, che permette una sola somministrazione giornaliera, una maggior rapidità di efficacia e una più bassa incidenza di effetti collaterali rispetto al PTU, che invece è preferito durante la gravidanza e l'allattamento, a causa dei potenziali effetti teratogeni del MMI (Cooper DS. 2005). Questi farmaci sono attivamente

trasportati e concentrati selettivamente nella tiroide contro un gradiente di concentrazione (Cooper DS. 2005; Marchant *et al.* 1972).

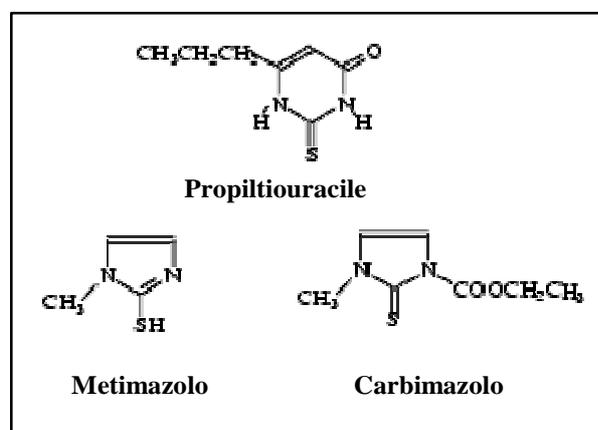


Fig.11 Le tionamidi: propiltiouracile, metimazolo e carbimazolo.

L'effetto primario delle tionamidi è quello di inibire la sintesi degli ormoni tiroidei interferendo con la perossidasi tiroidea, enzima che catalizza la iodinazione dei residui di tirosina della tireoglobulina, step fondamentale nella sintesi della tiroxina (T<sub>4</sub>) e della triiodotironina (T<sub>3</sub>) (Davidsson *et al.* 1978) (Fig. 12). Le tionamidi possono anche inibire la secrezione degli ormoni tiroidei e sembrano avere effetti immunomodulatori (Weetman AP. 1994).

In modo simile ad altre malattie autoimmuni, la malattia di Graves ha un'attività fluttuante ed i pazienti in alcuni casi, senza la somministrazione di alcun trattamento, entrano in remissione, fase caratterizzata da una significativa diminuzione dei livelli sierici di TRAb (Codaccioni *et al.* 1988). I pazienti trattati per un periodo di tempo con MMI o PTU rimangono frequentemente eutiroidei dopo la fine del trattamento (McGregor *et al.* 1980; Pinchera *et al.* 1969). Il meccanismo alla base della remissione sembra essere un'azione immunosoppressiva dei farmaci antitiroidei.

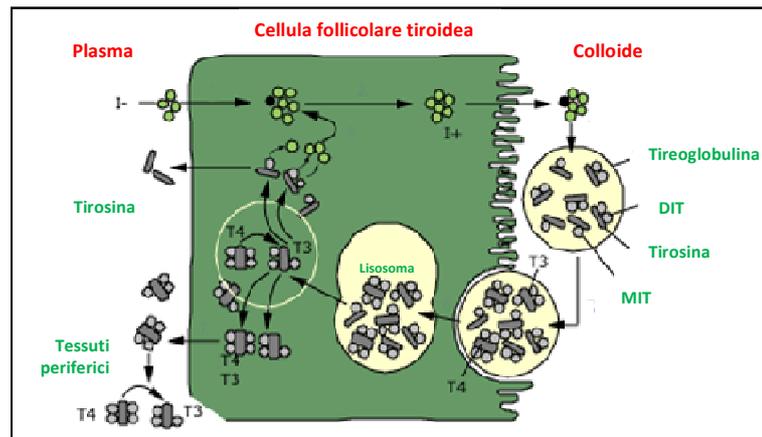


Fig.12 La sintesi degli ormoni tiroidei.

### 7.1.1. Effetti immunomodulatori del metimazolo

In pazienti sotto trattamento con farmaci antitiroidei, diminuiscono nel tempo le concentrazioni sieriche di molecole importanti da un punto di vista immunologico, come ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) ed i recettori solubili per IL-2 e IL-6 (Salvi *et al.* 1996; Sonnet *et al.* 1999). Inoltre, molti studi mostrano che il trattamento con MMI e PTU induce apoptosi dei linfociti intratiroidei, aumenta il numero dei linfociti T soppressori circolanti e diminuisce nella tiroide quello delle cellule Th, delle NK e delle T attivate (Corrales *et al.* 1997; Totterman *et al.* 1987).

Da queste evidenze, i farmaci antitiroidei sembrano avere effetti immunomodulatori diretti (Antonelli *et al.* 2006c; Cooper DS. 2005; McGregor *et al.* 1980; Weetman AP 1994), ma in realtà, esistono studi che dimostrano che i cambiamenti benefici del sistema immunitario dei pazienti affetti da GD siano dovuti ad effetti primari di questi farmaci sulle cellule tiroidee che determinano un miglioramento della funzione tiroidea, che ha effetti secondari sul sistema immunitario attraverso la riduzione del *signaling* "tirocita-immunocita" (Volpé R. 2001).

Questo effetto immunomodulatore indiretto sembra dovuto alla diminuzione nel

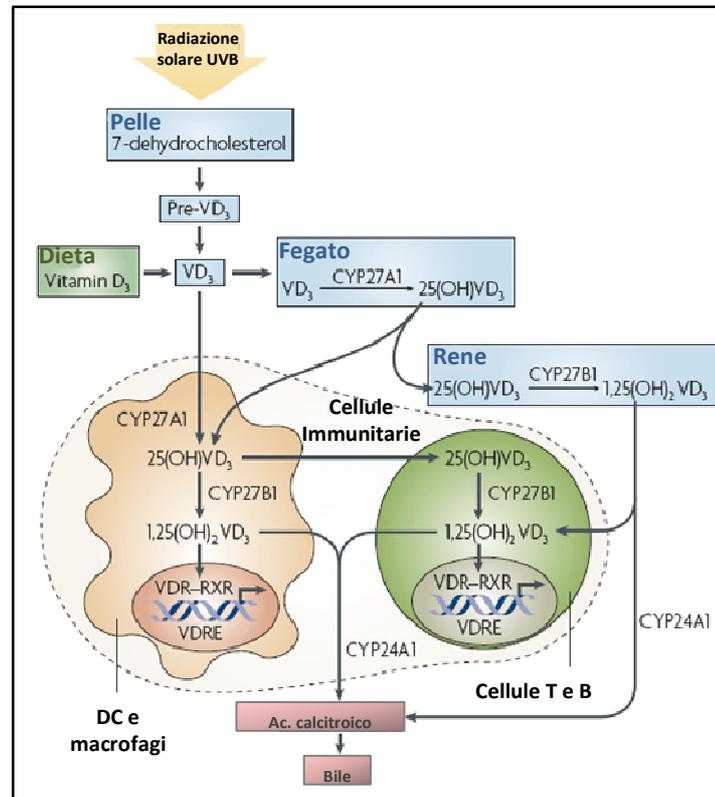
siero degli ormoni tiroidei, effetto che in un secondo momento riduce l'attività cellulare tiroidea e quindi riduce la presentazione degli antigeni tiroidei ai T linfociti infiltranti e la produzione di TRAb (Volpe R. 1994). In uno studio longitudinale di pazienti con ipertiroidismo di Graves (Wenzel *et al.* 1984), è stato osservata una remissione simile della GD, valutata come abbattimento dei livelli sierici di TRAb, durante la terapia con tionamidi e con perclorato. Il perclorato, farmaco che compete con lo iodio per l'uptake tiroideo, inibendo il suo trasportatore ha alcuni effetti sul sistema immunitario (Cooper DS. 2005), ma non tali da portare agli stessi effetti sui TRAb, come è stato osservato con la terapia con MMI (Lauberg P. 2006). Inoltre, se i farmaci antitiroidei possedessero proprietà immunosoppressive, una più alta dose o un trattamento di più lungo potrebbe aumentare le possibilità di remissione. Almeno sei trials prospettici hanno esaminato i possibili benefici di una terapia farmacologica ad alto dosaggio rispetto a quella normale, ma ad eccezione di uno solo, tutti sono risultati negativi (Azizi F. 2006). Per quanto riguarda la durata del trattamento, dati derivanti da trials prospettici con un follow-up di quattro anni, non hanno indicato nessun vantaggio sulla velocità di *relapse* con un trattamento più lungo di un anno (Cooper DS. 2005).

Com'è noto, le cellule tiroidee possono produrre vari tipi di molecole, come le chemochine, che possono poi influenzare il sistema immunitario. I farmaci antitiroidei possono influenzare i livelli delle chemochine nel sangue, poiché sono in grado di ridurre l'espressione delle citochine da parte delle TFC, determinando la diminuzione dell'infiltrato linfocitario nella ghiandola. Ciò spiegherebbe i bassi livelli di chemochine, associati con una bassa infiltrazione cellulare, trovati nel GD dopo il trattamento con questi farmaci (Weetman AP. 1994).

## **7.2. Gli analoghi della vitamina D: elocalcitolo**

La vitamina D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) è sintetizzata nella pelle a partire dal 7-deidrocolesterolo (Mora *et al.* 2008) tramite un processo dipendente dalla luce, in particolare dalla radiazione UVB (270–300 nm); in alternativa, può essere introdotta con la dieta o

tramite supplementi vitaminici.



**Fig.13** Formazione di 1,25-diidrossi-vitamina-D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) o calcitriolo, metabolita biologicamente attivo della vitamina D<sub>3</sub>. (da Mora *et al.* 2008)

La VD<sub>3</sub> viene poi convertita nel fegato in 25-idrossi-vitamina-D<sub>3</sub> (25(OH)VD<sub>3</sub>), biologicamente inattiva, che poi viene trasportata nei tubuli renali e convertita nei mitocondri dalla 1 $\alpha$ -idrossilasi in 1,25-diidrossi-vitamina-D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) o calcitriolo, metabolita biologicamente attivo e responsabile del mantenimento dell'omeostasi del calcio e del fosforo (Fig.13). Gli organi bersaglio del calcitriolo sono l'intestino, dove stimola l'assorbimento del calcio e del fosforo, il tessuto osseo, dove promuove la formazione dell'osso e la sua mineralizzazione e le paratiroidi, dove inibisce la secrezione dell'ormone paratiroideo.

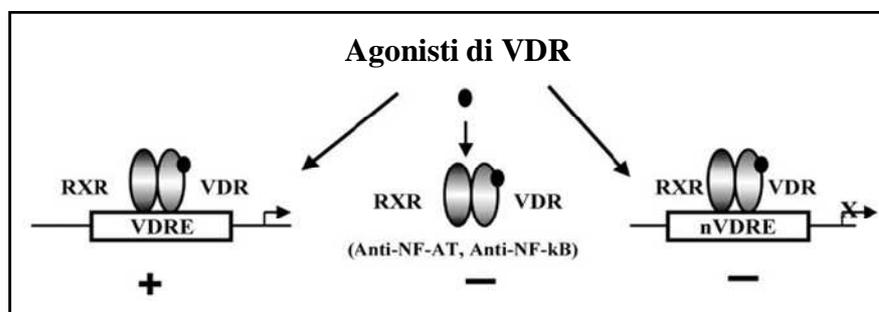
Gli effetti biologici della 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e degli analoghi sintetici sono mediati dal recettore per la vitamina D (*Vitamin D receptor*, VDR), membro della superfamiglia dei recettori nucleari (Norman AW. *et al* 2001). Il legame con il ligando induce cambiamenti conformazionali nel VDR, che promuovono

l'eterodimerizzazione con il recettore X per l'acido retinoico (*retinoid X receptor*, RXR) ed il reclutamento di varie proteine coattivatrici. Il VDR funziona da fattore di trascrizione attivato da ligando, che lega specifici elementi sulla sequenza del DNA, chiamati *vitamin D responsive elements* (VDRE) nei geni responsivi alla vitamina D ed infine influenza la velocità della trascrizione mediata dalla RNA polimerasi II.

Il VDR, come gli altri recettori nucleari, può essere funzionalmente suddiviso in 3 domini funzionali:

1. la regione N-terminale, che contiene un dominio di transattivazione ligando-indipendente, detto *activation function-1* (AF-1).
2. la regione centrale, che contiene il dominio di legame con il DNA, che consiste in due *C2-C2 type zinc fingers*, che permette al recettore di legarsi ai VDREs.
3. la regione C-terminale, che è un dominio multifunzionale contenente il dominio di legame del ligando (*ligand binding domain*, LBD), il motivo di eterodimerizzazione con RXR, e AF-2, dominio di transattivazione dipendente dal ligando.

Il VDR può modulare l'espressione dei VDRE in vari modi: legandosi ai VDREs presenti nelle regioni promoter di specifici geni può regolare la loro espressione in modo positivo oppure negativo, oppure può inibire l'espressione di certi geni, antagonizzando l'azione di fattori di trascrizione, come i fattori nucleari (NF)-AT and NF-κB (Nagpal *et al.* 2005) (Fig.14).



**Fig.14 Rappresentazione schematica della regolazione dell'espressione genica da parte degli agonisti di VDR.** (da Nagpal *et al.* 2005).

Accanto al meccanismo d'azione di tipo genomico, è stato suggerito che la vitamina D possa esercitare le proprie azione sulle cellule target anche attraverso effetti rapidi indipendenti dalla trascrizione genica de novo (van Etten *et al.* 2005).

Il VDR è espresso da molti tipi di cellule umane, come cheratinociti, cellule epiteliali, cellule della prostata, della mammella, del colon, della tiroide, del rene ed in molti tipi di cellule del sistema immunitario.

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  possiede, oltre alle attività cosiddette calcemiche, ovvero omeostasi del calcio e del fosforo e mantenimento del contenuto osseo, anche azioni di tipo non calcemico. Il VDR risulta coinvolto nella regolazione della crescita e della differenziazione di molti tipi di cellule e possiede anche importanti proprietà immunomodulatorie.

Queste proprietà pleiotropiche hanno portato allo studio della vitamina D nel trattamento di molte patologie, come la psoriasi (Tanghetti EA. 2009), l'iperparatiroidismo secondario (Slatopolsky *et al.* 2002), l'osteoporosi (Richy *et al.* 2004), il cancro della prostata, la mielodisplasia, l'artrite reumatoide, l'ipertrofia prostatica benigna (Crescioli *et al.* 2005), le malattie autoimmuni ed il rigetto del trapianto (Adorini L. 2005b).

La vitamina D presenta gravi effetti collaterali, come ipercalcemia, ipercalciuria e riassorbimento osseo, che non né permettono l'utilizzo ad alte dosi né della somministrazione sistemica. Per superare questo limite sono stati sintetizzati un grande numero di analoghi della vitamina D, che presentano anche una più ampia finestra terapeutica rispetto alla vitamina D stessa (Adorini L. 2002b).

La vitamina D è una molecola molto flessibile e gli analoghi presentano una combinazione di più modificazioni soprattutto a livello della catena laterale, dell'anello A, del gruppo CD ed occasionalmente dell'anello B (Bouillon *et al.* 2005) Tali modificazioni strutturali hanno permesso di sviluppare analoghi con una potenza maggiore, con una più bassa attività calcemica e con un aumento della specificità tissutale, in particolare alcuni analoghi presentano proprietà immunoregolatorie selettive.

Elocalcitololo, o BXL-628 (Fig.15) è un analogo della vitamina D non- ipercalcemico e un agonista del VDR selettivo e potente. Elocalcitololo sulla base

delle sue capacità di inibire la proliferazione cellulare della prostata in studi preclinici in vitro ed in vivo (Crescioli *et al.* 2004; Maggi M. *et al.* 2006) è stato testato in uno studio di fase clinica II per il trattamento di pazienti affetti da iperplasia prostatica benigna (*benign prostatic hyperplasia*, BPH) (Colli *et al.* 2006). BPH è una sindrome complessa, molto frequente, caratterizzata da una componente statica relativa alla crescita della prostata, da una componente dinamica responsabile dei sintomi irritativi urinari e da una componente infiammatoria.

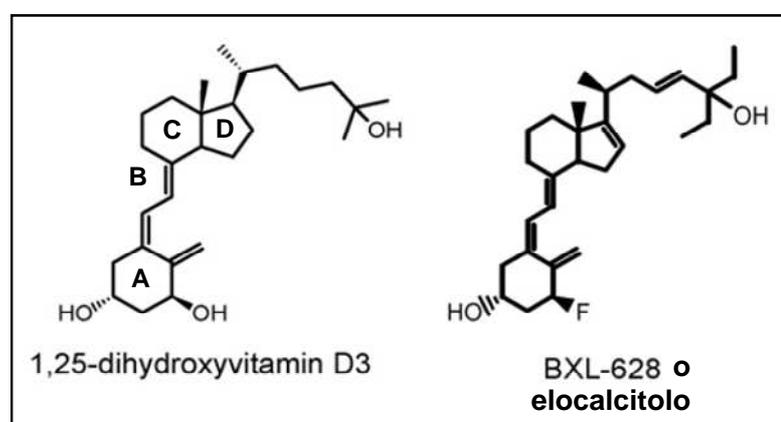


Fig.15 Formula di struttura di 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e di elocalcitolo.

I dati preclinici hanno dimostrato che elocalcitolo riduce la componente statica del BPH inibendo l'attività intra-prostatica dei fattori di trascrizione a valle del recettore androgenico e la componente dinamica colpendo le cellule della vescica (Crescioli *et al.* 2004; Crescioli *et al.* 2005). Questi dati hanno portato allo studio clinico che ha dimostrato con successo che i pazienti trattati con 150 µg al giorno di elocalcitolo per 90 giorni hanno un arresto della crescita della prostata (Colli *et al.* 2006). Inoltre, è stata dimostrata la sicurezza del farmaco (Campbell MJ. *et al.* 2006), in quanto i pazienti trattati con elocalcitolo mostravano un'incidenza di effetti avversi pari a quella del placebo e non hanno mostrato alterazioni patologiche del metabolismo del calcio e del fosforo (Colli *et al.* 2006).

### 7.2.1. Effetti immunomodulatori degli analoghi della vitamina D

Lo studio dei ligandi del VDR come potenziali agenti capaci di modulare le risposte delle cellule T (Bhalla *et al.* 1984) nasce dall'osservazione della presenza del VDR in molti tipi di cellule del sistema immunitario (Provvedini *et al.* 1983), in particolare in APCs come macrofagi e DCs, ma anche linfociti T CD4+ e CD8+. Topi deficienti per VDR presentano forti anomalie immunologiche, suggerendo che VDR possiede una funzione importante nel sistema immunitario (Mathieu *et al.* 2001). Inoltre, topi incapaci di sintetizzare 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, poiché mancanti dell'enzima 25-idrossivitaminaD-1 $\alpha$ -idrossilasi, mostrano una riduzione significativa dei linfociti T CD4+ e CD8+ periferici (Panda *et al.* 2001). Inoltre, la 1 $\alpha$ -idrossilasi che converte la 25(OH)VD<sub>3</sub> in 25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub> nel rene, è anche espressa nei macrofagi attivati e nelle DCs (Fritsche *et al.* 2003).

I target immunologici principali della 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e dei suoi analoghi sono le cellule APCs e le cellule T. Le APCs ed in particolare le DCs, critiche nell'induzione delle risposte immuni mediate dalle cellule T, sono target chiave dei ligandi del VDR, che sia *in vitro* and *in vivo* sono in grado di modularne il fenotipo e la funzione (Penna *et al.* 2000). La 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ed i suoi analoghi inibiscono la produzione di IL-12 da parte delle APCs (D'Ambrosio *et al.* 1998), citochina critica per lo sviluppo delle cellule Th1 ed inibiscono la differenziazione e la maturazione delle DCs (Penna *et al.* 2000). Il trattamento *in vitro* di DCs umane con i ligandi del VDR determina la down-regolazione dell'espressione delle molecole costimolatorie CD40, CD80, CD86, la diminuzione della produzione di IL-12 e l'aumento di IL-10, risultando in una diminuzione dell'attivazione delle cellule T. In particolare, i ligandi del VDR inducono le proprietà tollerogeniche delle DCs, favorendo l'aumento del numero di cellule T reg CD4+CD25+ (Gregori S. *et al.* 2001).

L'induzione delle proprietà tollerogeniche è stata dimostrata anche *in vivo*, come dimostrato in modelli di rigetto di trapianto tramite somministrazione orale ai topi riceventi (Gregori S. *et al.* 2001) o alle DC trasferite *in vitro* (Griffin *et al.* 2001). Sebbene le DCs siano il target primario delle azioni immunomodulatorie dei

ligandi del VDR, questi possono anche agire direttamente sulle cellule T. La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inibisce la proliferazione delle cellule T indotta dagli antigeni (Bhalla *et al.* 1984) e la produzione delle citochine (Rigby *et al.* 1987). Inibisce inoltre in modo selettivo dello sviluppo di linfociti Th1 (Lemire *et al.* 1995), sebbene non sia ancora chiaro se quest'effetto fosse diretto o dovuto alla modulazione delle funzioni delle APC. Comunque molte citochine chiave prodotte dai linfociti T sono state dimostrate essere target diretti dei ligandi del VDR, in particolare citochine di tipo Th1 come IL-2 e IFN- $\gamma$ . Recentemente è stato dimostrato che la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  riduce la polarizzazione delle cellule Th2 tramite un effetto diretto sulle cellule CD4+ naïve (Boonstra *et al.* 2001) e questo potrebbe essere un effetto benefico dei ligandi del VDR nel trattamento delle malattie autoimmuni e nel rigetto del trapianto. Inoltre la  $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$  inibisce anche le risposte mediate dai Th17, probabilmente grazie alla capacità di inibire la produzione di IL-6 e IL-23 (Daniel *et al.* 2008; Penna *et al.* 2006) ed induce la differenziazione e l'espansione delle cellule Treg Foxp3+ (Penna *et al.* 2005).

I meccanismi immunosoppressivi hanno incoraggiato l'uso della vitamina D per la prevenzione e la terapia di modelli animali e di malattie umane, in particolari quelle guidate da linfociti Th1 (Orbach *et al.* 2007).

I livelli nel siero di vitamina D sono spesso ridotti in pazienti con diabete di tipo I (Littorin *et al.* 2006) e con LES (Muller K. *et al.* 1995) e i livelli di vitamina D sono inversamente correlati con l'attività della malattia in pazienti affetti da artrite reumatoide (Cutolo *et al.* 2007). La deficienza di vitamina D in topi deficienti di IL-10 accelera l'infiammazione intestinale, che sviluppa nella malattia infiammatoria intestinale (Cantorna *et al.* 2000).

Sebbene i bambini con rachitismo (tipicamente causato da un insufficiente apporto di vitamina D con la dieta) avessero una più alta incidenza di diabete di tipo I rispetto a bambini con sufficiente apporto (van Etten *et al.* 2005), la supplementazione di vitamina D durante l'infanzia negli anni '60 era associata con una marcata diminuzione nel rischio di diabete di tipo I nei 30 anni successivi.

Le proprietà immunomodulatorie e gli effetti benefici dei ligandi del VDR analoghi sono state studiate in differenti modelli sperimentali di malattie

autoimmuni (Adorini L. 2002b):

- *artrite indotta dal collagene*: diminuzione dell'incidenza e della severità
- *diabete autoimmune*: inibizione dell'insulite e riduzione del diabete
- *encefalomielite sperimentale allergica*: prevenzione e trattamento dei sintomi, inibizione del *relapse*
- *tiroidite sperimentale autoimmune*: riduzione delle lesioni istologiche con somministrazione insieme a ciclosporina A (CsA) (Fournier *et al.* 1990)
- *malattia intestinale infiammatoria*: significativo miglioramento dei sintomi e blocco della progressione della malattia
- *psoriasi*: inibizione dell'attivazione leucocitaria e miglioramento dei segni istologici e clinici
- *LES*: inibizione della proteinuria e prevenzione delle lesioni della pelle
- *prostatite autoimmune sperimentale*: inibizione della risposta infiammatori intraprostatica (Penna *et al.* 2006)

Gli analoghi della vitamina D sono in grado non solo di prevenire, ma anche di trattare le malattie autoimmuni in corso, come dimostrato dalla loro capacità di inibire lo sviluppo del diabete di tipo I nel topo NOD adulto (Gregori G. *et al.* 2002) e di inibire la ricorrenza della malattia autoimmune dopo il trapianto delle isole pancreatiche, o di migliorare significativamente il *relapsing* cronico della EAE indotta nei topi Bozzi con omogenato di cordone spinale.

Ad oggi l'unica applicazione clinica degli agonisti del VDR è quella del trattamento topico della psoriasi (Ashcroft *et al.* 2000). La psoriasi è un'inflammatione cronica della pelle, che coinvolge un'iperproliferazione dei cheratinociti, mediata dai linfociti Th1. Gli agonisti del VDR hanno un'azione combinata nella pelle, poiché sono in grado di modulare entrambi i tipi di cellule coinvolti nella patogenesi della malattia, inibendo la proliferazione e la produzione delle citochine infiammatorie da parte dei linfociti T infiltranti (Barna *et al.* 1997) e determinando effetti pro-apoptotici sui cheratinociti nelle lesioni (Fukuya *et al.* 2002).

Un'altra importante area d'applicazione è l'inibizione del rigetto del trapianto, come dimostrano differenti studi in vitro ed in vivo (Adorini *et al.* 2002a; Becker *et al.* 2002), in cui la vitamina D ed i suoi analoghi sono in grado di prolungare la

sopravvivenza del trapianto in diversi modelli sperimentali, che includono il cuore, il fegato, le isole pancreatiche, la pelle. Gli agonisti del VDR sono potenzialmente interessanti da utilizzare in cocktail farmacologici per ridurre le dosi terapeutiche di farmaci immunosoppressivi convenzionali (ad esempio la CsA) nel trattamento del rigetto del trapianto non solo acuto ma anche cronico, come documentato dall'inibizione dell'infiammazione adventizia e dell'iperplasia dell'intima nei trapianti di aorta nel ratto (Räisänen-Sokolowski *et al.* 1997). È stato dimostrato che la perdita d'organo renale diminuisce in pazienti trattati con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Aschenbrenner *et al.* 2000), suggerendo la sua capacità di inibire il rigetto cronico, molto interessante in termini di potenziale applicazione clinica.

Inoltre, per il controllo del rigetto sembrano importanti alcune proprietà degli agonisti del VDR, ovvero l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce e della produzione di citochine (Adorini *et al.* 2005a). Recentemente è stata dimostrata la capacità di BXL-01-0029, un analogo della vitamina D, di inibire in cardiomiociti umani la secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  in modo più potente dell'acido micofenolico (Sottili *et al.* 2009), il solo agente immunosoppressivo efficace sulle cellule cardiache (Crescioli *et al.* 2008). In particolare BXL-01-0029 sembra prevenire l'attivazione del *pathway* del TNF- $\alpha$  (fosforilazione e traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B) (Sottili *et al.* 2009).

Il coinvolgimento del sistema endocrino della vitamina D in molti processi biologici, che modulano le risposte immunitarie e le proprietà tollerogeniche degli agonisti del VDR, rendono questa classe di composti particolarmente interessanti per il trattamento d'altre malattie autoimmuni nell'uomo (Adorini *et al.* 2005a).

I livelli di vitamina D risultano bassi nei pazienti affetti da GD e tiroidite di Hashimoto (Orbach *et al.* 2007). Tra i fattori genetici che sono stati associati con la suscettibilità di GD, oltre ai geni HLA di classe II, localizzati sul cromosoma 6q21, al CTLA-4 sul cromosoma 2q33, sembra anche coinvolto il VDR sul cromosoma 12q12-14 (Maalej *et al.* 2008; Ramos-Lopez *et al.* 2005). Inoltre, è stato dimostrato che la somministrazione del metabolita attivo della vitamina D, da solo o in combinazione con CsA, previene le tiroiditi autoimmuni in modelli animali (Fournier *et al.* 1990; Ramos-Lopez *et al.* 2005).

### 7.3. Agonisti di PPAR $\gamma$ : rosiglitazone

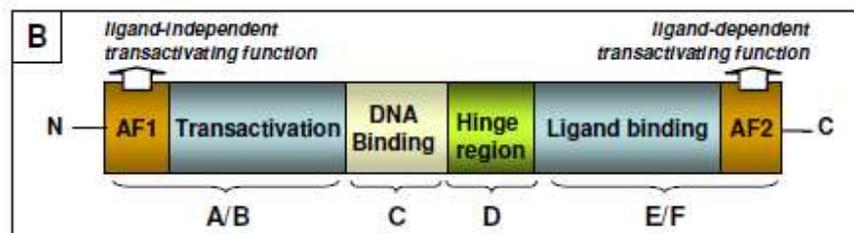
I tiazolidinedioni (TZD) sono una classe di farmaci insulino-sensibilizzanti utilizzati nel trattamento del diabete mellito di tipo 2.

Il primo TZD approvato dalla FDA per il trattamento di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 è stato il troglitazone (TRO), che in seguito è stato ritirato dal commercio a causa di effetti epatotossici. I due TZD attualmente disponibili sono il Rosiglitazone (RGZ: Avandia) e il Pioglitazone (PIO: Actos) (Yki-Järvinen H. 2004).

I TZD sono ligandi sintetici di PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor*  $\gamma$ ), membro della famiglia dei recettori nucleari ligando-dipendenti (Berger *et al.* 2002) che regola l'espressione di geni *target*, che giocano un ruolo chiave nella regolazione del glucosio, del metabolismo lipidico, del tono vascolare e dell'infiammazione (Barbier *et al.* 2002).

Ad oggi sono stati identificati tre sottotipi di PPARs (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ ) ciascuno dei quali ha una distinta distribuzione tissutale e una specifica attività biologica.

I PPARs, come il VDR e gli altri recettori nucleari, condividono una struttura modulare suddivisibile in quattro domini funzionali (Luconi *et al.* in press) (Fig.16).



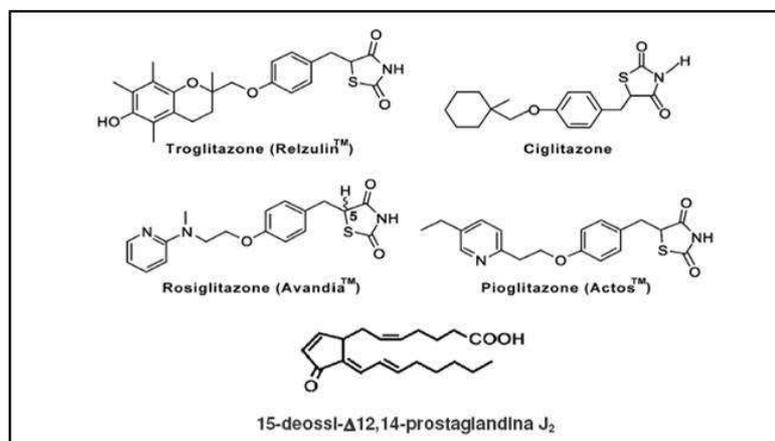
**Fig.16** Schematica rappresentazione dei domini strutturali di PPAR $\gamma$  (da Luconi *et al.* in press).

La porzione N-terminale A/B contiene un dominio di transattivazione indipendente dal ligando (AF-1) fondamentale per la regolazione dell'attività di PPAR. Il dominio C, contenente il motivo zinc-finger di legame con il DNA,

riconosce nelle regioni promotrici dei geni *target* specifiche sequenze dette PPRE (*PPAR Response Element*), mentre il dominio D è essenziale per legare cofattori. La porzione C-terminale E/F contiene sia il dominio di legame per il ligando sia il dominio AF-2, che lega cofattori essenziali per il processo di trascrizione genica (Kota *et al.* 2005).

Nell'uomo sono state identificate due isoforme di PPAR $\gamma$  generate a partire da promotori diversi o per *splicing* alternativo. PPAR $\gamma$ 1 si trova in tessuti diversi (fegato, muscolo scheletrico, rene, intestino), mentre PPAR $\gamma$ 2 è quasi esclusivamente espresso a livello del tessuto adiposo dove regola l'adipogenesi (Kota *et al.* 2005).

PPAR $\gamma$ , oltre ad essere attivato da agonisti sintetici della famiglia dei TZDs, ha numerosi ligandi endogeni tra cui acidi grassi polinsaturi a lunga catena (acido linoleico, acido arachidonico), derivati eicosanoidi e lipidi ossidati (9-HODE, 15-HETE). La 15-deossi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) sembra essere il più potente ligando endogeno di PPAR $\gamma$  (Bell-Parikh *et al.* 2003) (Fig.17).



**Fig. 17** Ligandi sintetici e naturali di PPAR $\gamma$ .

Questi ligandi endogeni sono capaci di attivare PPAR $\gamma$  *in vitro*; data la loro bassa affinità per PPAR $\gamma$  ed i loro livelli di concentrazione molto bassi non sufficienti a stimolare il recettore nelle cellule (Bell-Parikh *et al.* 2003), non vi è quindi la certezza che *in vivo* essi siano gli effettivi ligandi di PPAR $\gamma$  (Varga *et al.* 2008). Ad oggi sono i ligandi sintetici i più potenti attivatori di PPAR $\gamma$  conosciuti.

Molti degli effetti dei TZDs sono esercitati attraverso la modulazione dell'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$  (effetti genomici). PPARs, attivato dal legame con il ligando, può regolare la trascrizione genica attraverso due meccanismi (Yki-Järvinen H. 2004) (Fig.18):

1. *Transattivazione*: è un meccanismo DNA-dipendente. Dopo il legame con il ligando, PPAR $\gamma$ , va incontro a modificazioni conformazionali che permettono la formazione di un eterodimero con RXR, che riconosce specifici elementi responsivi sul DNA, detti PPRE, nella regione promoter di geni target, dei quali viene attivata la trascrizione. Il complesso attivato PPAR $\gamma$ /RXR recluta dei cofattori, la cui varietà determina la specificità della risposta a livello del tessuto, della cellula e del gene. Questo meccanismo d'attivazione di geni specifici sembra essere fondamentale per l'omeostasi glicidica e lipidica e per la regolazione dell'adipogenesi.
2. *Transrepressione*: è un meccanismo DNA-indipendente che interferisce con i *pathways* d'altri fattori di trascrizione. PPAR $\gamma$  può interferire con l'attività di fattori di trascrizione come NF-kB, AP-1 e STATs, regolando in modo negativo l'espressione dei rispettivi *responsive genes*. La transrepressione sembra essere la modalità con cui i TZDs esercitano la loro azione anti-infiammatoria.

Oltre agli effetti a lungo termine, i ligandi di PPAR $\gamma$  esercitano anche azioni non genomiche che essendo molto rapide (minuti) non sono compatibili con un meccanismo di regolazione dell'attività trascrizionale (LeBrasseur *et al.* 2006; Luconi *et al.* in press). Questi effetti dovrebbero coinvolgere le interazioni del recettore con secondi messaggeri intracellulari ed extranucleari, come chinasi e fosfatasi. Rimane che il ruolo effettivo del recettore nel mediare le azioni rapide dei suoi ligandi è ancora controverso (Luconi *et al.* in press).

Un nuovo meccanismo rapido dei TZD è stato recentemente caratterizzato in cellule endoteliali umane di microcircolo (Lombardi *et al.* 2008). Il RGZ interferisce con le azioni pro-infiammatorie di TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (induzione della secrezione di citochine infiammatorie, espressione di molecole di adesione) attraverso l'inibizione della fosforilazione/attivazione di ERK1/2 stimolata da

TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Lombardi *et al.* 2008; Lombardi *et al.* 2009). RGZ interferisce in modo rapido con fosforilazione/attivazione di ERK1/2 e con l'attività di PI3K che media la proliferazione indotta da IGF-1 in cellule umane di tumore adrenocorticale (Cantini *et al.* 2008), anche confermata in cellule PC3 di cancro della prostata (Papageorgiou *et al.* 2008).

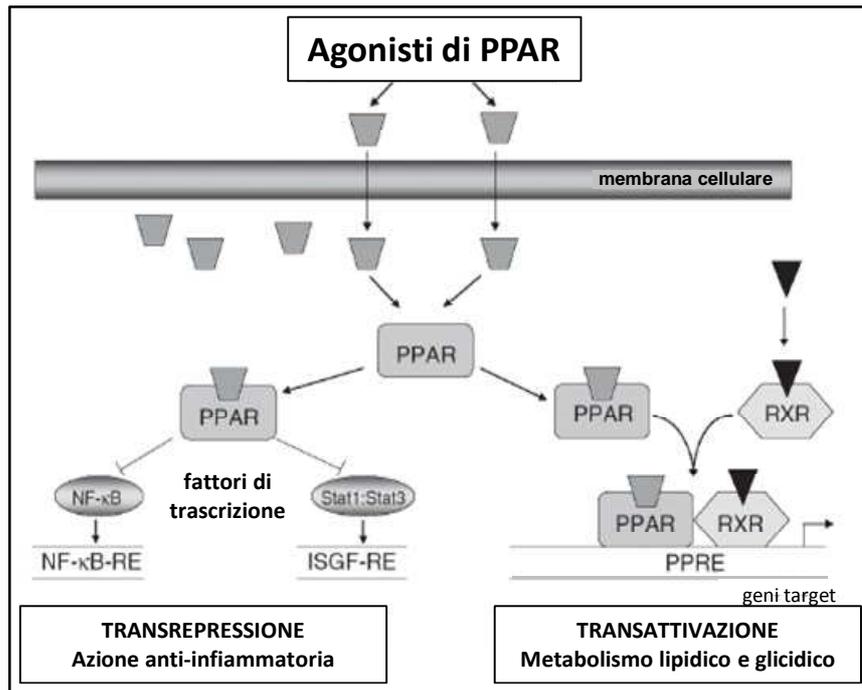


Fig 18 Meccanismo d'azione degli agonisti di PPAR $\gamma$ . ( da Yki-Järvinen H. 2004)

### 7.3.2. Effetti anti-infiammatori dei tiazolidinedioni

I TZDs sono farmaci insulino-sensibilizzanti che determinano la diminuzione della concentrazione d'insulina nel sangue (Staels *et al.* 2005). L'azione insulino-sensibilizzante si esplica principalmente in due modi. Attraverso un diretto sul tessuto adiposo, i TZDs promuovono l'uptake e l'accumulo degli acidi grassi liberi (*free fatty acid*, FFA) nel tessuto adiposo, riducendo così livelli sierici di FFA (Yki-Järvinen H. 2004). Con un'azione indiretta a livello del fegato e del muscolo scheletrico, i TZDs aumentano l'espressione e la traslocazione sulla

superficie cellulare dei trasportatori del glucosio (GLUT-1 e GLUT-4), aumentano l'up-take di glucosio nelle cellule epatiche e muscolari e riducono i livelli di glucosio nel sangue. Inoltre, sono in grado di modulare l'espressione delle adipochine, molecole prodotte dagli adipociti che esercitano un'importante azione sul metabolismo, in particolare diminuiscono i livelli sierici di TNF- $\alpha$ , citochina coinvolta nello sviluppo dell'insulino-resistenza ed aumentano l'espressione dell'adiponectina, molecola insulino-sensibilizzante (Yki-Järvinen H. 2004; Giannini *et al.* 2004).

Le modulazioni farmacologiche di PPAR $\gamma$  come trattamento terapeutico per il diabete sono state collegate ad un abbassamento del grado dello stato infiammatorio associate con questa patologia. In particolare in pazienti affetti da diabete di tipo 2 e trattati con RGZ è stata osservata una diminuzione della concentrazione plasmatica di *marker* infiammatori, quali CRP, IL-6 e MMP-9 (*matrix metalloprotease-9*) (Haffner *et al.* 2002). Sempre più numerose sono le evidenze sperimentali che attribuiscono ai TZD altre proprietà oltre alla capacità di regolare il metabolismo lipidico e l'omeostasi glicidica; in particolare sono oggetto di studio l'azione anti-infiammatoria e le loro proprietà antineoplastiche. PPAR $\gamma$  è presente in molti tipi di cellule come le endoteliali, le muscolari della parete vascolare, i tireociti ed in particolare è presente nelle cellule del sistema immunitario, come macrofagi, linfociti, DCs, monociti (Daynes *et al.* 2002; Yki-Jarvinen H. 2004).

L'ipotesi che gli agonisti di PPAR $\gamma$  possano regolare i processi infiammatori è supportata da diversi studi in vivo. In particolare, i ligandi di PPAR $\gamma$  sono in grado in modelli sperimentali animali di sopprimere l'artrite adjuvante (Kawahito *et al.* 2000), di inibire l'aterosclerosi (Li AC. *et al.* 2000), di inibire le risposte infiammatorie e la misura dello *stroke* in seguito ad occlusione cerebrovascolare (Niino *et al.* 2001), di migliorare la malattia intestinale di tipo infiammatorio (Su *et al.* 1999) ed i segni clinici di EAE (Diab *et al.* 2002).

Alcuni effetti anti-infiammatori dei ligandi del PPAR $\gamma$  derivano da un'azione diretta sulle cellule del sistema immunitario. Gli agonisti del PPAR $\gamma$  determinano una rapida inibizione dell'attivazione dei macrofagi e la conseguente diminuzione della produzione di citochine (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) (Jiang *et al.* 1998). In DCs, i

TZDs riducono la secrezione di IL-12 e l'espressione di molecole costimolatorie quali CD80 e CD86 (Gosset *et al.* 2001).

Inoltre i ligandi del PPAR $\gamma$  inibiscono la proliferazione dei linfociti T e riducono la produzione di TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-2 (Clark *et al.* 2000; Marx *et al.* 2002). Infine l'attivazione di PPAR $\gamma$  determina risposte anti-infiammatorie anche attraverso l'induzione dell'apoptosi nelle cellule immunitarie (Chinetti *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2002).

I ligandi del PPAR $\gamma$  possono anche modulare la funzione delle cellule T in modo indiretto, inibendo la produzione di chemochine da parte delle cellule endoteliali (Marx *et al.* 2000). Il trattamento di cellule endoteliali con agonisti di PPAR $\gamma$  inibisce l'espressione dell'mRNA e della proteina delle chemochine indotte da IFN- $\gamma$  (CXCL9, 10 e 11) ed il rilascio dell'attività chemotattica di linfociti trasfettati per CXCR3. Inoltre, è stato dimostrato che i ligandi di PPAR $\gamma$  diminuiscono la severità dello stato infiammatorio in due modelli murini di colite diminuendo i livelli di CXCL10 (Schaefer *et al.* 2005; Su *et al.* 1999) e che in DCs, gli agonisti di PPAR $\gamma$  down-regolano la sintesi di CXCL10 e di RANTES (CCL5) (Gosset *et al.* 2001), chemochine coinvolte nel reclutamento dei linfociti Th1.

Perciò l'attività di PPAR $\gamma$  potrebbe essere coinvolta nella regolazione dell'espressione delle chemochine indotte dall'IFN- $\gamma$  nell'autoimmunità umana e gli agonisti di PPAR $\gamma$  potrebbero attenuare il reclutamento delle cellule T attivate nei siti dell'infiammazione mediata dai Th1 (Gosset *et al.* 2001; Marx *et al.* 2000; Schaefer *et al.* 2005).

Recentemente è stata dimostrata la presenza di PPAR $\gamma$  nel tessuto tiroideo (Kasai *et al.* 2000) e nel tessuto orbitale di pazienti con GO (Mimura *et al.* 2003). È stato dimostrato che il trattamento con dosi terapeutiche di RGZ di cellule follicolari tiroidee, fibroblasti orbitali, o preadipociti ottenuti da pazienti con GO, inibisce in modo significativo la secrezione di CXCL10 indotta da IFN- $\gamma$ , suggerendo che PPAR $\gamma$  potrebbe essere coinvolto nella regolazione dell'espressione delle chemochine indotte dall'IFN- $\gamma$  nelle malattie autoimmuni tiroidee e nel GO (Antonelli *et al.* 2006d).

## SCOPO DELLA RICERCA

La malattia di Graves (GD) è una malattia autoimmune della tiroide, la cui patogenesi è una reazione citotossica di tipo Th1 caratterizzata da iperproduzione di citochine pro-infiammatorie, come IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

La chemochina CXCL10 gioca un ruolo fondamentale nella fisiopatologia e nelle fasi iniziali di GD, determinando la migrazione dei linfociti T attivati esprimenti il recettore CXCR3 verso le cellule follicolari tiroidee presentanti l'antigene. Le cellule follicolari sono coinvolte nel processo autoimmunitario proprio attraverso la produzione di CXCL10, perpetuando così il loop autoimmunitario.

Studi *in vitro* su tireociti umani hanno dimostrato che la secrezione di CXCL10 viene sinergicamente indotta da IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Obiettivo di questo progetto di ricerca è stato studiare i meccanismi alla base dell'azione sinergica sulla secrezione di CXCL10, allestendo e caratterizzando un modello *in vitro* di tireociti umani. Esperimenti in citofluorimetria e Real-time PCR sono stati effettuati per studiare l'effetto delle due citochine sull'espressione del recettore per IFN- $\gamma$  e per TNF- $\alpha$ , ed analisi Western blot e microscopia ad immunofluorescenza per studiare le vie di segnalazione intracellulare attivate dalle due citochine (NF- $\kappa$ B e STAT-1).

Numerosi studi indicano che il metimazolo (MMI), farmaco utilizzato nel trattamento dell'ipertireoidismo, oltre all'azione sulla tireoperossidasi, possiede anche un'azione immunosoppressiva. In particolare, MMI interferisce con i segnali immunologici associati a GD e diminuisce i livelli sierici di CXCL10. Pertanto, è stato valutato se le cellule tiroidee fossero un target biologico di MMI in termini di secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). È stata anche testata l'azione sulla secrezione di CXCL10 di altri due farmaci, di cui recentemente sono emerse proprietà anti-infiammatorie: rosiglitazone (RGZ), agonista sintetico di PPAR $\gamma$ , utilizzato nel trattamento del diabete di tipo 2, ed elocalcitololo (o BXL-628), agonista non ipercalcemico del

recettore della vitamina D, attualmente in fase clinica II per il trattamento dell'iperplasia prostatica benigna.

La fase iniziale di GD è caratterizzata da una risposta infiammatoria di tipo Th1, mentre nella fase tardiva è presente una risposta di tipo Th2. I livelli di CXCL10 nel sangue correlano in modo inverso rispetto alla durata di GD.

Per capire se i farmaci, MMI, RGZ, ed elocalcitolo, siano in grado di modulare la risposta linfocitaria, è stata valutata l'azione *in vitro* di MMI, RGZ, ed elocalcitolo in linfociti T CD4+ purificati umani, attivati con specifici stimoli e capaci di secernere citochine di tipo Th1, Th2 e Th17.

# MATERIALI E METODI

## 1. Chemicals

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 medium (1:1) (DMEM/F12) con e senza rosso fenolo, tampone fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) senza  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , albumina di siero fetale (*Bovine Serum Albumin*, BSA) fraction V, penicillina, streptomina, tripsina, RPMI 1640, Ficoll-Hypaque, forbol13-acetato12-miristato (*Phorbol12-myristate13-acetate* o PMA, P), Ionomicina (*Ionomycin*, I) sono di Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Collagenasi di tipo IV è di Worthington (Lakewood, NJ, USA). L-glutammina, aminoacidi non essenziali, piruvato e 2-mercaptoetanolo sono di Life Technologies, Inc. Laboratories (Grand Island, NY). Il siero fetale bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS) è di Unipath (Bedford, UK), mentre il siero fetale di vitello (*Fetal Calf Serum*, FCS) è di HyClone (Logan, UT). Trypan blue è di Euroclone (Pavia, Italy).  $\beta$ -mercaptoetanolo è stato acquistato da Fluka Biochemika Ultra (Buchs, Switzerland).

MMI è di Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), RGZ è di Glaxo (Welwyn, UK), elocalcitolo di BioXell (Milan, Italy).

Le citochine ricombinanti umane TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ed i kits ELISA per la determinazione quantitativa di CXCL10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-17 umani sono di R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Il kit ELISA per IL-5 umana è di Arcus (Modena, Italy). Per la determinazione di IL-4 è stato utilizzato un saggio ELISA *homemade* utilizzando anticorpi monoclonali (mAb) di BD Biosciences PharMingen (San Diego, CA) (Parronchi *et al.* 1998).

Tutti i primer e le sonde (TaqMan Gene Expression Assays), CXCL10 (Hs00171042-m1), IFN- $\gamma$  (Hs00989290-g1), TNF- $\alpha$  (Hs00174128-m1), IL-17 (Hs00174383-m1), IL-4 (Hs00929862-m1), IL-5 (Hs00174200-m1), IFNGR1

(Hs00166223-m1), Pax8 (Hs00247586-m1) e la Universal Master Mix 1x sono di Applied Biosystems (Foster City, CA). Quantitative PCR human reference total RNA è di Stratagene (La Jolla, CA).

Per l'analisi citofluorimetrica, l'anticorpo monoclonale (mAb) coniugato con ficoeritrina (PE) anti-CD119/IFNR è di BD Biosciences (Mountain View, CA USA), mentre gli mAbs PE-coniugati anti-TNFR1 e anti-TNFR2 sono di R&D Systems, gli mAbs di controllo isotipico sono di Southern Biotechnology Associated Inc. (Birmingham, AL, USA).

Per analisi Western blot e/o microscopia ad immunofluorescenza immunocitochimica, gli anticorpi primari rabbit anti-pSTAT-1 (Tyr701), mouse anti-pNF- $\kappa$ B (Ser536), mouse anti-pI $\kappa$ B (Ser32/36), e anti-I $\kappa$ B sono di Cell Signaling (Danvers, MA); rabbit anti-STAT-1 e anti- $\beta$ -actina, rabbit anti-NF- $\kappa$ B p65 (C-20) sono di Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA); mouse anti-Tg è di Cell Marque Corp. (Hot Spring, AR); goat anti-Pax8 è di Abcam plc (Cambridge, UK); l'anticorpo coniugato Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit è di Molecular Probes (Eugene, OR); gli anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano sono di Sigma-Aldrich.

Tutti i reagenti per SDS-PAGE sono di GE Healthcare Bio-Sciences Corp. (Piscataway, NJ). Il materiale plastico sterile monouso è di Corning (Milan, Italy).

## 2. Colture cellulari di tireociti umani

Le colture primarie di tireociti umani sono state ottenute dal parenchima inter-nodulare sano derivante dal tessuto tiroideo di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per gozzo multinodulare, previo consenso informato del paziente.

I tireociti sono stati preparati secondo il protocollo seguito dal gruppo di Garcia-Lopez (Garcia-Lopez *et al.* 2001) al quale sono state apportate alcune modifiche. Il protocollo d'isolamento prevede una dissociazione di tipo enzimatico e meccanico. I tessuti tiroidei, lavorati entro 2-3 h dal prelievo in camera operatoria, sono stati ripuliti da eventuali residui di tessuto connettivo presente, lavati in tampone fisiologico, tagliati con il bisturi in frammenti di piccole dimensioni e

digeriti enzimaticamente con collagenasi di tipo IV (2 mg/ml in PBS) a 37°C per 45 minuti. La digestione è stata bloccata con DMEM/F12 supplementato con il 10% di FBS, e dispersa meccanicamente fino ad ottenere una sospensione omogenea, che è stata poi centrifugata a 1300 rpm per 5 minuti. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso e messo in coltura in piastre petri di polistirene per coltura cellulare da 100 mm nel loro mezzo di coltura specifico, costituito da DMEM/F12 supplementato con 2 mmol/l di L-glutammina, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina, e 10 % di FBS, in incubatore con temperatura di 37°C, umidità relativa del 95% ed il 5% CO<sub>2</sub> (medium di crescita).

Dopo 24 ore dalla semina il medium di crescita viene cambiato e dopo circa 48 ore le cellule cominciano a crescere in monostrato. Una volta confluenti, le cellule che presentano inibizione da contatto della proliferazione, vengono staccate per trattamento enzimatico con tripsina, ripiastrate con rapporto 1:2 e mantenute nel loro mezzo di crescita. Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule tiroidee entro il 5-6° passaggio (p) di coltura.

### **3. Colture cellulari di linfociti CD4+ umani**

*Peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) sono state isolate a partire da *buffy coats* ottenuti da donatori adulti sani anonimi in accordo con l'approvazione del comitato etico. Le PBMCs sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque).

Le cellule T CD4+ *untouched* sono state isolate da PBMCs totali tramite *cell sorting* magnetico, utilizzando il kit *Human CD4+ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec, Bisley, Germany). Si tratta di un metodo indiretto a marcatura magnetica che isola le cellule T CD4+ per selezione negativa, ovvero per deplezione di tutte le cellule T non-CD4+, ad esempio cellule CD8+, cellule T  $\gamma/\delta$ , cellule B, cellule NK, DC, monociti, granulociti ed eritrociti. Le cellule T non-CD4+ sono state marcate con un cocktail di anticorpi primari monoclonali coniugati con la biotina contro CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123

TCR $\gamma/\delta$  e Glicoforina A, e poi con un secondario monoclonale anti-biotina coniugato con delle biglie magnetiche (*MicroBeads*). Le cellule sono state fatte passare attraverso una colonna (*MACS Column*) posizionata su un campo magnetico di un *MACS Separator*: le cellule T non-CD4<sup>+</sup> marcate magneticamente vengono trattenute dal campo magnetico nella colonna, mentre quelle CD4<sup>+</sup> passano attraverso la colonna con l'eluato.

Le cellule T CD4<sup>+</sup> sono mantenute in coltura in RPMI 1640 supplementato con 2 mmol/l di L-glutamina, 1% di aminoacidi non essenziali, 1% di piruvato,  $2 \times 10^{-5}$  M di 2-mercaptoetanololo, e 10% FCS in incubatore con temperatura di 37°C, umidità relativa del 95% ed il 5% CO<sub>2</sub>. La purezza della popolazione separata mediante sorter è stata valutata con il citofluorimetro ed è risultata sempre maggiore del 95%. La vitalità della popolazione cellulare è stata valutata tramite esclusione al colorante trypan blue (soluzione 0.05% vol/vol in PBS): le cellule sono state diluite 1:1 con la soluzione colorante e poi contate con una camera di Burker, escludendo dalla conta le cellule morte colorate con il trypan blue.

#### 4. Saggi di secrezione di citochine

Per valutare la secrezione di CXCL10 da parte dei tireociti, sono state piastrate 4.000 cellule in piastre da 96 pozzetti nel medium di crescita. Dopo 24h, il medium è stato rimosso, le cellule sono state lavate con PBS ed incubate in medium senza rosso fenolo e senza siero (medium *serum-free*). Dopo 24h, diversi tipi di stimoli sono stati aggiunti al medium *serum-free* con 0.1% BSA. Come controllo sono state utilizzate cellule coltivate nello stesso medium contenente anche il veicolo necessario per la solubilizzazione degli stimoli (etanolo assoluto, 0.47%, vol/vol).

Per i saggi di dose-risposta, le cellule sono state incubate per 24h con:

- TNF- $\alpha$  alle concentrazioni di 0.1, 1, 10, 100 e 500 ng/ml.
- IFN- $\gamma$  10, 100, 1000, 5000 e 10000 U/ml, da solo o in combinazione con 10 ng/ml di TNF- $\alpha$ .

- IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) + TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) in presenza o in assenza di MMI (1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 ng/ml), RGZ (0.05, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30  $\mu$ M) o elocalcitolo ( $10^{-13}$ – $10^{-6}$  M).

Dopo le 24h di stimolo, i supernatanti cellulari sono stati raccolti e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  in apposite piastre da congelamento di polipropilene fino al momento di effettuare il dosaggio ELISA per CXCL10.

Direttamente nella piastra di coltura da 96 pozzetti è stata effettuata la quantizzazione del contenuto proteico cellulare totale, espresso in  $\mu\text{g}$ , necessaria per la normalizzazione dei valori di secrezione citochinica. L'estrazione delle proteine totali è stata effettuata con NaOH 1 M per 5 min, che determina la lisi delle cellule, e con il reagente Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) per 10–15 min. La concentrazione proteica è stata poi misurata con lo spettrofotometro a 595 nm.

Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato o in quadruplicato con 4–7 differenti preparazioni cellulari.

Per valutare la secrezione di citochine da parte dei linfociti T CD4 $^{+}$ , sono state piastrate 200.000 cellule in piastre da 96 pozzetti a fondo rotondo nel medium di crescita e stimulate PMA 1  $\mu\text{M}$  e Ionomicina 10 ng/ml con o senza MMI ( $2.63 \times 10^{-6}$  M), RGZ ( $5 \times 10^{-6}$  M), o elocalcitolo ( $10^{-8}$  M). Dopo 48h, i supernatanti cellulari sono stati raccolti, centrifugati a 1200 rpm per 10 min per rimuovere le cellule, e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  in apposite piastre da congelamento di polipropilene fino al momento di effettuare i dosaggi ELISA.

Gli esperimenti sono stati effettuati in esaplicato con 6 differenti preparazioni cellulari.

## **5. Dosaggi ELISA**

La determinazione quantitativa delle concentrazioni delle citochine CXCL10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-5 nei supernatanti di colture cellulari è stata fatta con la tecnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), utilizzando kit

commerciali e seguendo i protocolli consigliati, mentre i livelli di IL-4 sono stati misurati utilizzando un saggio ELISA *homemade* (Parronchi *et al.* 1998).

Il saggio ELISA è un test immunoenzimatico a *sandwich* su fase solida, che permette di effettuare un'analisi di tipo quantitativo. In breve, i pozzetti di una micropiastra da 96 vengono rivestiti con un anticorpo specifico per la citochina di interesse. I campioni, comprensivi degli standards e dei controlli, vengono pipettati nei pozzetti: se la citochina è presente viene immobilizzata nel pozzetto dall'anticorpo. Dopo aver effettuato un lavaggio per eliminare tutto ciò che non si è legato, viene aggiunto un anticorpo specifico secondario legato ad un enzima specifico per la citochina, e dopo un altro lavaggio, viene aggiunta una soluzione substrato che determina la formazione di una colorazione in proporzione alla quantità di citochina che si è legata nello step iniziale. Lo sviluppo del colore viene poi bloccato da un reagente specifico e l'intensità del colore viene misurata ad una specifica lunghezza d'onda con lo spettrofotometro. I valori della concentrazione della citochina si ottengono per interpolazione sulla curva standard allestita con concentrazioni note crescenti della citochina.

La sensibilità dei saggi è di 0.41–4.46 pg/ml per CXCL10, minore di 8.0 pg/ml per IFN- $\gamma$ , di 0.5–5.5 pg/ml per TNF- $\alpha$ , minore di 15 pg/ml per IL-17 e IL-4, e minore di 4 pg/ml per IL-5. I coefficienti di variazione *intra-assay* e *inter-assay* sono 3.1 e 6.7% per CXCL10, 2.6 e 6.4% per IFN- $\gamma$ , 5.3 e 6.8% per TNF- $\alpha$ , 4.1 e 8.6% per IL-17, 3.6 e 6.8% per IL-5.

I campioni sono stati analizzati in quadruplicato per i tireociti ed in duplicato per i linfociti T CD4+. I risultati ottenuti sono stati espressi come pg/ $\mu$ g di proteine totali per i tireociti e come pg/ml per le cellule T CD4+.

## 6. Estrazione dell'RNA

Per l'analisi dell'mRNA delle cellule tiroidee, sono state piastrate 500.000 cellule in piastre da 60 mm e, dopo 24h di adesione, sono state mantenute in medium *serum-free* per 24h. Poi, le cellule sono state incubate in medium *serum-free* con

0.1% BSA con differenti stimoli:

- IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) da soli o combinati
- TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) combinato con MMI (300 ng/ml), RGZ (5  $\mu$ M) o elocalcitolo ( $10^{-8}$  M).

Cellule coltivate nello stesso medium contenente anche il veicolo necessario per la solubilizzazione degli stimoli (etanolo assoluto, 0.47%, vol/vol) sono state utilizzate come controllo.

Dopo di che, i tireociti sono stati staccati in tripsina, lavati due volte in PBS, centrifugati, ed i pellet cellulari sono conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Gli esperimenti sono stati effettuati 3-4 volte con differenti preparazioni cellulari.

Per l'analisi dell'mRNA dei linfociti, le cellule, incubate secondo lo stesso protocollo degli esperimenti di secrezione citochinica, sono state raccolte tramite centrifugazione, ed i pellet cellulari sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  prima dell'estrazione. Gli esperimenti sono stati effettuati 4 volte con differenti preparazioni cellulari.

L'RNA totale viene stato estratto dai campioni con il kit *RNeasy Mini* (QIAGEN, Milan, Italy) in accordo con il protocollo della ditta produttrice. Questa procedura prevede l'utilizzo di particolari colonne (*spin column*) dotate di una membrana di silice, che adsorbe l'RNA e lascia passare le proteine e gli altri componenti cellulari permettendo di ottenere un RNA altamente puro. I pellet cellulari sono stati risospesi e lisati in 350  $\mu$ l di buffer RLT contenente 10  $\mu$ l/ml di  $\beta$ -mercaptoetanololo, il quale, oltre alla lisi, permette una rapida inibizione dell'enzima RNAsi. Il lisato viene omogenato per agitazione su vortex. Si precipita l'RNA mediante aggiunta di etanolo al 70% e si procede all'isolamento mediante passaggio attraverso la membrana di silice a cui si lega l'RNA. Eventuali tracce di DNA contaminante, che si possono anche legare alla membrana di silice, sono eliminati mediante trattamento con l'enzima DNAsi I. A questo punto si eseguono una serie di lavaggi con appropriati *buffer* che rimuovono la presenza di contaminanti (sali, metaboliti ed altri componenti cellulari). L'RNA puro viene infine eluito con  $\text{H}_2\text{O}$  RNasi-free.

La concentrazione (ng/ $\mu$ l) e la qualità (R260/280) dell'RNA sono stati misurati

con lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

## 7. Real-Time PCR

L'RNA totale viene retrotrascritto in cDNA usando il *TaqMan Reverse Transcription Reagents* kit (Applied Biosystems). La miscela di reazione per la retrotrascrizione contiene KCl 500 mM, EDTA 0.1 mM, Tris-HCl (pH 8.3) 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5.5 mM, nucleotidi trifosfato (dNTP) 500 μM, esameri random 2.5 μM, inibitore dell'RNase 0.4 U/μl, l'enzima Multiscribe Reverse Transcriptase 1.25 U/μl e 400 ng di RNA per un volume finale di 80 μl. Le condizioni di reazione prevedono un protocollo di tre step: 25°C per 10 min, 48°C per 30 min, e 95°C per 3 min.

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata con la Real-Time PCR (*Polymerase Chain Reaction*) in metodica TaqMan. La quantità di mRNA *target*, normalizzata rispetto a un gene endogeno *housekeeping* di riferimento (GAPDH), e relativa ad un calibratore (Quantitative PCR human reference total RNA) è stata espressa come  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al.* 2001), utilizzando per la quantificazione il metodo della comparazione dei Ct la formula applicata è:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gene target}} - Ct_{\text{GAPDH}}) - (Ct_{\text{gene target calibratore}} - Ct_{\text{GAPDH calibratore}})$$

Per ciascun campione, 12.5 ng di cDNA sono aggiunti a 10 μl di miscela di reazione contenente una mix di specifici primers/sonda (Taqman Gene Expression Assay; Applied Biosystems) e la Universal Master Mix 1x (Applied Biosystem). I campioni sono stati sottoposti a 95°C per 3 min seguiti da 40 cicli di amplificazione a 95°C per 15 sec e 60°C per 1 min) con lo strumento ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

## 8. Analisi citofluorimetrica

Per l'analisi citofluorimetrica, i tireociti sono stati seminati in piastre da 100 mm in medium di crescita. Quando è stata raggiunta la confluenza (circa  $10^6$  di cellule), il medium di crescita è stato rimosso, sono stati fatti due lavaggi in PBS ed è stato aggiunto medium *serum-free* per 24h. Poi, le cellule sono state incubate per 24h in medium *serum-free* con 0.1% BSA, con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) da soli o combinati ed in presenza o assenza di MMI ( $2.63 \times 10^{-6}$  M), RGZ ( $5 \times 10^{-6}$  M) o elocalcitolo ( $10^{-8}$  M). Sono state utilizzate come controllo, cellule coltivate nello stesso medium contenente anche il veicolo necessario per la solubilizzazione degli stimoli (etanolo assoluto, 0.47%, vol/vol).

Dopo le 24h di stimolo, le cellule sono state staccate con EDTA 20 mM e contate in una camera emocitometrica; quindi sono state centrifugate a 1300 RPM per 5 min per rimuovere l'EDTA, ed i pellet risospesi in 1 ml di PBS.

L'analisi citometrica è stata effettuata sulle sospensioni cellulari:  $10^5$  cellule sono state incubate con anticorpi monoclonali specifici o di isotipo di controllo a  $+4^\circ\text{C}$  per 30 min, le cellule sono poi state lavate con PBS (pH 7.2) contenente 0.5% di BSA e successivamente analizzate ad un citofluorimetro BDLSRII utilizzando il software Diva (BD Biosciences). Per ciascun campione sono stati acquisiti almeno  $10^4$  eventi. L'area di positività è stata determinata usando un mAb di controllo isotipico (controllo negativo).

Gli esperimenti sono stati effettuati almeno quattro volte con differenti preparazioni cellulari.

## 9. Analisi Western blot

Per l'analisi proteica, le cellule tiroidee (800000 in piastre da 100 mm) sono state mantenute in medium *serum-free* per 24h ed incubate per 15 min in medium *serum-free* contenente BSA a 0.1% con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml),

con o senza MMI ( $2.63 \times 10^{-6}$  M), RGZ ( $5 \times 10^{-6}$  M), o elocalcitolio ( $10^{-8}$  M).

Le cellule sono state raccolte meccanicamente a freddo con *scrapers* con una soluzione di PBS e l'inibitore delle fosfatasi tirosiniche ortovanadato (OVA) 1 mM. Dopo centrifugazione, i pellet cellulari sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Per la determinazione della concentrazione proteica, i pellet cellulari sono stati lisati con specifico tampone di estrazione, composto da Tris 20 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, Triton X-100 0.5%, OVA 1 mM, PMSF (*Phenyl-Methyl-Sulphonyl Fluoride*) 1 mM, per 20 min in ghiaccio.

La determinazione del contenuto proteico totale dei lisati cellulari è stata effettuata con il metodo di Bradford (Bradford MM. 1976) che utilizza come reattivo il Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Bio-Rad protein assay*, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

Il reattivo in soluzione madre si trova in forma cationica con massimo di assorbimento a 470 nm (rosso), mentre quando lega alle proteine (forma anionica) si determina uno spostamento del massimo di assorbimento a 595 nm (blu) in soluzione. Dalla lettura spettrofotometrica a 595 nm, è possibile risalire alla concentrazione proteica dei campioni tramite interpolazione su una curva standard allestita con concentrazioni note crescenti di BSA.

Dopo la misurazione della concentrazione, le proteine sono state separate mediante gel di poliacrilammide SDS-PAGE (Sodio Dodecil Solfato-PoliAcrilammide Gel Elettroforesi) e poi sottoposte ad analisi Western blot.

La separazione proteica dei lisati cellulari è stata eseguita mediante elettroforesi SDS-PAGE secondo la metodica di Laemmli (Laemmli UK. 1970).

Brevemente, tra due lastre di vetro separate da spaziatori sono stati colati e fatti polimerizzare consecutivamente due diversi gel, *separating* e *stacking gel*, contenenti rispettivamente acrilammide al 10% e al 4%. Aliquote di 20  $\mu\text{g}$  di proteine, risospese in Sample Buffer 1x, formato da 12,5% Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), 10% glicerolo, 2% SDS, 5% ditiotreitolo, 0.00125% Blu di bromofenolo, sono state bollite per 5 min e poi caricate su di un gel riducente al 10% assieme a standard di pesi molecolari (Fermentas). La corsa elettroforetica è stata eseguita in un opportuno tampone di corsa (3.02 g/l Tris-HCl, 14.4 g/l glicina, 1 g/l SDS) secondo i seguenti parametri: 1h, 300 V, 50 mA.

Terminata la corsa elettroforetica, le proteine sono state sottoposte a elettrotrasferimento su membrana di nitrocellulosa Optitran (Schleicher & Schuell). Il trasferimento è stato effettuato in un opportuno tampone refrigerato (10% metanolo, glicina 192 mM, Tris 25 mM) secondo i seguenti parametri: 2 h, 100 V, 350 mA. Dopo il trasferimento, i siti non specifici delle membrane sono stati bloccati mediante incubazione con una soluzione al 5% di latte scremato in TTBS (Tween Tris-buffered saline: 0.1% Tween-20, Tris 20 mM, NaCl 150 mM) per 1h a  $T_{amb}$ . Le membrane sono state poi incubate a 4°C con gli anticorpi primari, ciascuno ad un'appropriata diluizione in TTBS (per pSTAT-1, pNF- $\kappa$ B, STAT-1 1:1000, per p-I $\kappa$ B 1:500, e per anti- $\beta$  actin 1:10000), sino al giorno successivo. Dopo 2 lavaggi di 15 min in TTBS le membrane sono state incubate 2 h con gli specifici anticorpi secondari (anti-*mouse*, anti-*rabbit*, o anti-*goat*) coniugati con la perossidasi di rafano, alla diluizione 1:3000 v/v. Dopo 2 lavaggi di 15 min le membrane sono state incubate 1 min con il substrato *enhanced chemiluminescence system* (ECL Plus; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) ed il segnale di chemiluminescenza acquisito con lo strumento ChemiDoc XRS instrument (BIORAD Labs). Ciascuna immagine Wester blot mostrata è rappresentativa di una serie derivante da almeno 3 esperimenti indipendenti.

Per verificare l'egual caricamento proteico in ogni pozzetto del gel, le membrane sono state normalizzate: dopo procedura di *stripping* con una specifica soluzione (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), le membrane, sono state re-incubate con un nuovo anticorpo primario appropriato, diretto o contro la forma non fosforilata della proteina in esame o contro una proteina *housekeeping* ubiquitaria.

## 10. Microscopia ad immunofluorescenza

Su vetrini coprioggetto sono stati piastrati  $10^4$  tireociti nel medium di crescita per 24h. La valutazione di Tg e Pax8 è stata effettuata dopo un'incubazione *overnight* in medium serum-free, mentre per valutare l'attivazione di STAT-1 e NF- $\kappa$ B, è stata effettuata anche una stimolazione per 30 min con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) da solo

o combinato con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml), in presenza o in assenza di MMI (300 ng/ml), RGZ (5  $\mu$ M) o elocalcitolo ( $10^{-8}$  M). Sono state utilizzate come controllo cellule coltivate nello stesso medium *serum-free* con 0,1% BSA e il veicolo (etanolo assoluto, 0,47%, vol/vol).

Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate incubando per 10 min i vetrini con paraformaldeide al 3.7% (pH 7.4) e poi permeabilizzate con PBS e Triton X-100 al 0.1% per 10 min. I vetrini sono stati lavati nuovamente in PBS, incubati 30' a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) con una soluzione bloccante, e poi incubati con i rispettivi anticorpi primari anti-Tg (diluizione 1:200), anti-Pax8 (diluizione 1:200), anti-NF- $\kappa$ B p65 (diluizione 1:100) ed anti-p-STAT-1 (diluizione 1:100). Dopo aver lavato con PBS, i vetrini sono stati incubati 30 min a  $T_{amb}$  con l'anticorpo secondario goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 coniugato (diluizione 1:200). I controlli negativi (non mostrati) sono stati preparati secondo la procedura descritta escludendo però la fase d'incubazione con l'anticorpo primario. I vetrini sono stati coperti con vetrini coprioggetto e sigillati.

Le immagini sono state acquisite con un microscopio a contrasto di fase con epifluorescenza (Nikon Microphot-FX, Nikon, Tokyo, Japan). La percentuale delle cellule positive è stata calcolata contando il numero delle cellule marcate rispetto al numero totale di cellule presenti, almeno in 15 campi differenti e separati del vetrino. Gli esperimenti sono stati effettuati almeno tre volte con differenti preparazioni cellulari.

## **11. Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il programma SPSS 12.0 (SPSS for Windows 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Per verificare la distribuzione normale dei dati è stato usato il test di Kolmogorov-Smirnov. È stato eseguito il test ANOVA (*One-way analysis of variance*) seguito da correzione *post hoc* di Dunnett o di Bonferroni per confronti multipli. Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. Il programma ALLFIT (NIH, Bethesda,

MD, USA; De Lean *et al.* 1978) è stato utilizzato per analizzare le curve dose-risposta ed ottenere i valori di IC<sub>50</sub>.

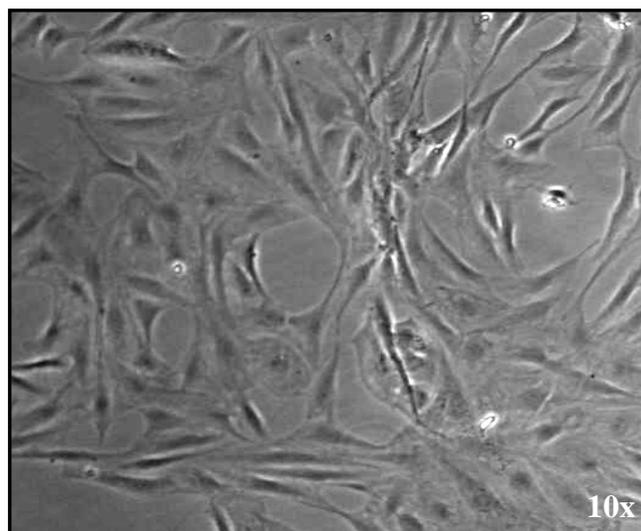
I risultati sono stati espressi come media±errore standard (SE, standard error).

# RISULTATI

## 1. Caratterizzazione del modello sperimentale di tireociti umani

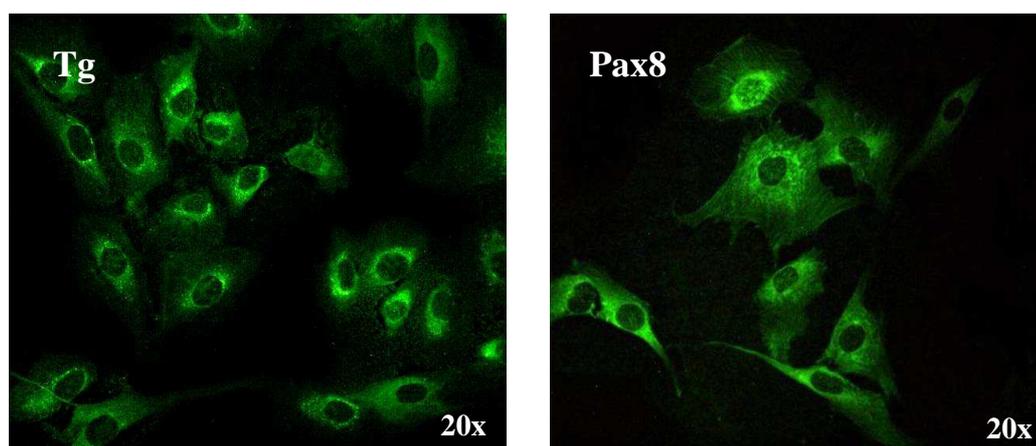
Le colture primarie di tireociti umani sono state ottenute dal parenchima inter-nodulare sano tiroideo di 15 pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per gozzo (aumento del volume della tiroide di tipo non tossico, ovvero eutiroideo o ipotiroideo), previo consenso informato del paziente. I pazienti erano costituiti da 10 donne, con età compresa tra 37 e 83 anni ( $61.3 \pm 3.9$  anni), e da 5 uomini con età compresa tra 32 e 81 anni ( $64.3 \pm 5.5$ ). I pazienti non avevano ricevuto nessun trattamento farmacologico anti-tiroideo, e gli esami del sangue mostravano i livelli degli ormoni tiroidei e degli autoanticorpi tiroidei nel *range* normale.

In Figura 1 sono riportate cellule tiroidee in coltura, ottenute dai tessuti tiroidei per dissociazione di tipo enzimatica e meccanica.



**Fig. 1** Tireociti umani in coltura a passaggio 5. Ingrandimento: 10x.

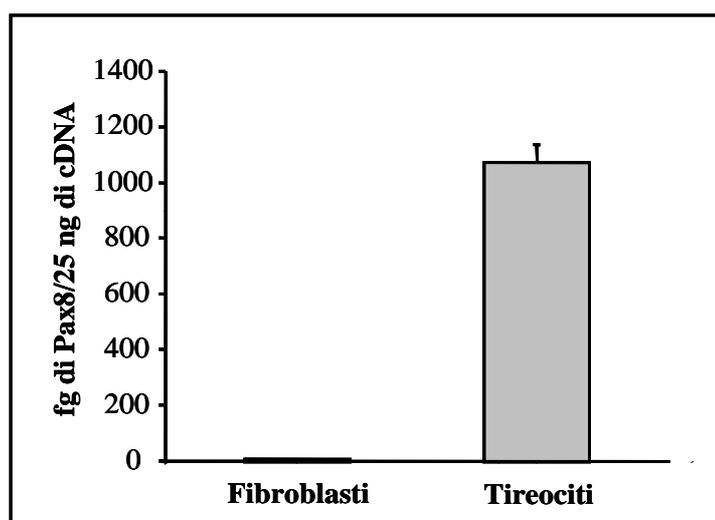
Le cellule tiroidee sono state caratterizzate tramite microscopia a immunofluorescenza per valutare la presenza della proteina tireoglobulina e del fattore di trascrizione Pax8, essenziale per lo sviluppo ed il mantenimento dei tireociti differenziati nell'adulto (Kang *et al.* 2001). Cellule tra il 5° ed il 6° passaggio sono risultate positive per Tg ( $89.76 \pm 1.86$  %) e per Pax8 ( $88.34 \pm 1.86$  %) (Fig.2). La contaminazione della popolazione da parte di cellule differenti dai tireociti, valutata come differenza ottenuta tra le cellule positive e le cellule totali, era del 8-10% per Tg e del 10-11% per Pax8. La percentuale delle cellule positive è stata calcolata contando il numero delle cellule marcate rispetto al numero totale di cellule presenti, almeno in 15 campi differenti e separati del vetrino su 3 differenti popolazioni cellulari.



**Fig.2** Staining per Tg (sinistra) e per Pax8 (destra) nei tireociti umani, valutata con microscopia ad immunofluorescenza. Ingrandimento: 20x.

Inoltre, tramite Real-Time PCR quantitativa sono stati valutati i livelli di Pax8 nell'mRNA, estratto dalle cellule in coltura (Fig.3).

I risultati ottenuti mostrano la presenza di Pax8 negli estratti raccolti rispetto ad un controllo negativo (fibroblasti umani).



**Fig.3** Determinazione dei livelli dell'mRNA di Pax8 (espressi come fentogrammi di Pax8 su 25 ng di cDNA) tramite Real-Time quantitativa PCR nei tireociti e nei fibroblasti umani. I risultati sono espressi come media $\pm$ SE di triplicati di preparati cellulari di colture primarie di differenti donatori.

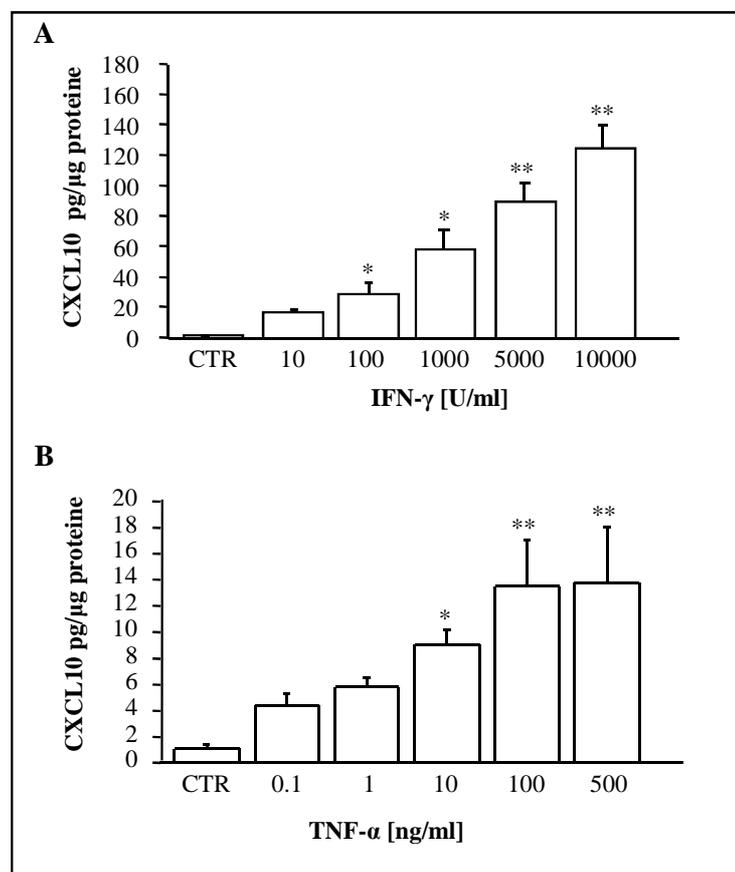
## 2. Effetto delle citochine pro-infiammatorie sulla secrezione di CXCL10 nei tireociti umani

Per valutare l'effetto delle citochine pro-infiammatorie sui tireociti umani, le cellule tiroidee sono state trattate con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e dopo 24h di stimolo, sono stati misurati i livelli della chemochina CXCL10 nei supernatanti cellulari.

Il trattamento per 24h di dosi crescenti di IFN- $\gamma$  (10-10000 U/ml) determina una secrezione di CXCL10 significativamente più alta rispetto a quella presente nei supernatanti cellulari di cellule controllo, nei quali la chemochina risulta non misurabile; in particolare, l'effetto è dose-dipendente e non raggiunge un plateau.

La quantità di CXCL10 secreto va da  $16.94\pm 1.01$  pg/ $\mu$ g di proteine totali alla dose più bassa, a  $125.0\pm 16.96$  pg/ $\mu$ g alla dose più alta. (Fig.4A). Il trattamento con dosi crescenti di TNF- $\alpha$  (0.1-100 e 500 ng/ml) determina un aumento della secrezione di CXCL10 rispetto ai livelli di controllo. La prima dose di TNF- $\alpha$  che determina un aumento statisticamente significativo della chemochina secreta è 10 ng/ml. In questo caso, la curva dose risposta della chemochina secreta risulta molto più

bassa rispetto a quella di IFN- $\gamma$  e raggiunge un plateau ( $13.49 \pm 4.49$  pg/ $\mu$ g proteine, valore medio al plateau) (Fig.4B).

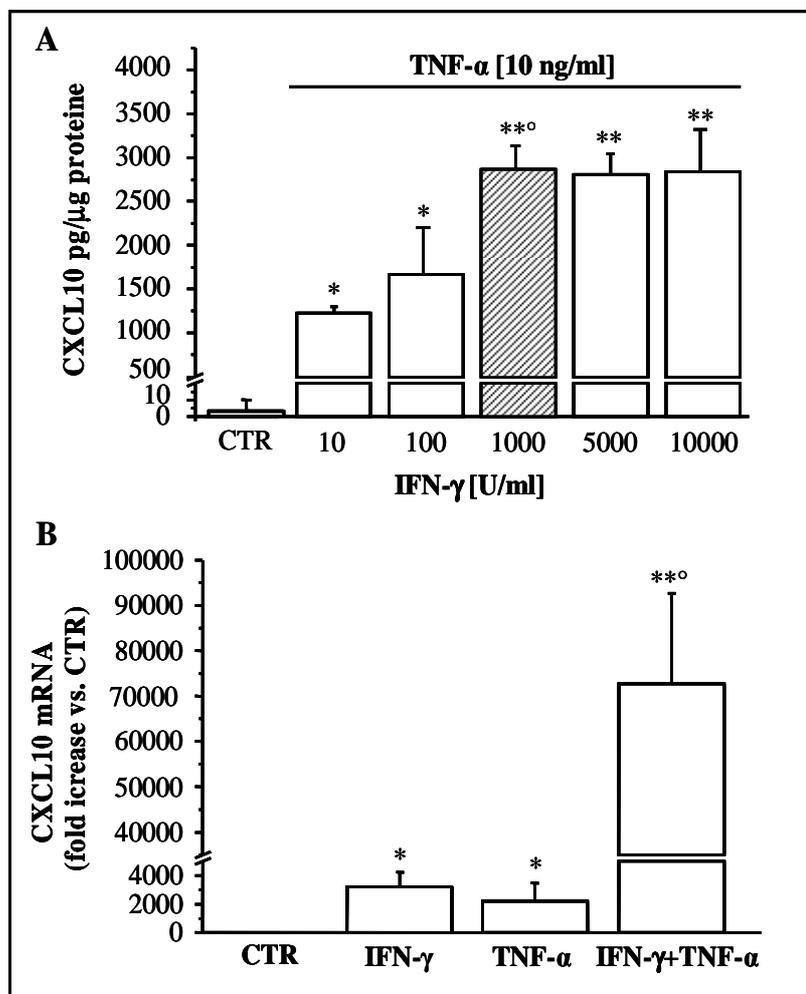


**Fig.4 A.** Dosi crescenti di IFN- $\gamma$  (10-10000 U/ml) aumentano significativamente in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10 rispetto alle cellule di controllo (CTR). **B.** Il trattamento con concentrazioni crescenti di TNF- $\alpha$  (0.1-100 e 500 ng/ml) aumenta significativamente la secrezione di CXCL10, sebbene la quantità sia minore rispetto a quella indotta da IFN- $\gamma$  (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  verso cellule controllo). I dati sono espressi come media $\pm$ SE e derivano da 4-7 esperimenti separati, utilizzando preparazioni cellulari distinte ( $n=4-7$ ) La secrezione di CXCL10 è indotta da IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nei tireociti umani.

L'aggiunta simultanea della dose fissa di TNF- $\alpha$  10 ng/ml a dosi crescenti di IFN- $\gamma$  (10-10000 U/ml), determina un'amplificazione della secrezione di CXCL10 indotta da IFN- $\gamma$ , raggiungendo una risposta superiore ad ogni dose testata in confronto alla dose corrispondente di IFN- $\gamma$  da solo (Fig.5A).

La combinazione delle due citochine determina un forte effetto sinergico. I livelli di CXCL10 secreti sono compresi tra  $1225.50 \pm 41.09$  e  $2866.35 \pm 229.43$  pg/ $\mu$ g di proteine. Il sinergismo tra le due citochine è inizialmente dose-dipendente e poi

raggiunge un plateau. La massima secrezione di CXCL10,  $2866.35 \pm 229.43$  pg/ $\mu$ g proteine totali (valore medio al plateau), si ottiene combinando TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) (Fig.5A).



**Fig.5 A.** Una dose fissa di TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) aumenta la secrezione di CXCL10 indotta da IFN- $\gamma$  nei tireociti (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  verso controllo, o verso la corrispondente dose di IFN- $\gamma$  da solo,  $^{\circ}P < 0.05$  verso la dose precedente). I dati sono espressi come media $\pm$ SE e derivano da 4-7 esperimenti separati utilizzando preparazioni cellulari distinte (n=4-7). **B.** L'espressione dell'mRNA di CXCL10 nei tireociti trattati con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) e TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) viene up-regolata dalle singole citochine e potenziata dalla loro combinazione (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  verso controllo,  $^{\circ}P < 0.05$  verso l'espressione indotta da IFN- $\gamma$ ). L'espressione dell'mRNA di CXCL10 è espressa come *fold increase* verso l'espressione in cellule di controllo, prese come 1. I dati sono espressi come media $\pm$ SE e derivano da 3 esperimenti separati utilizzando preparazioni cellulari distinte (n=3).

Questa combinazione è in accordo con studi precedenti svolti sempre su tireociti umani condotti da Antonelli *et al.* (Antonelli *et al.* 2006d), ed è la combinazione di citochine utilizzata per gli esperimenti successivi.

Tramite esperimenti di Real-Time PCR è stato dimostrato che stimolando le cellule per 24h con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) e con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) viene up-regolata l'espressione dell'mRNA di CXCL10, e che la combinazione delle due citochine determina un forte aumento dell'espressione dell'mRNA di CXCL10 di ben 23 volte rispetto all'espressione indotta dalle singole citochine (Fig.5B).

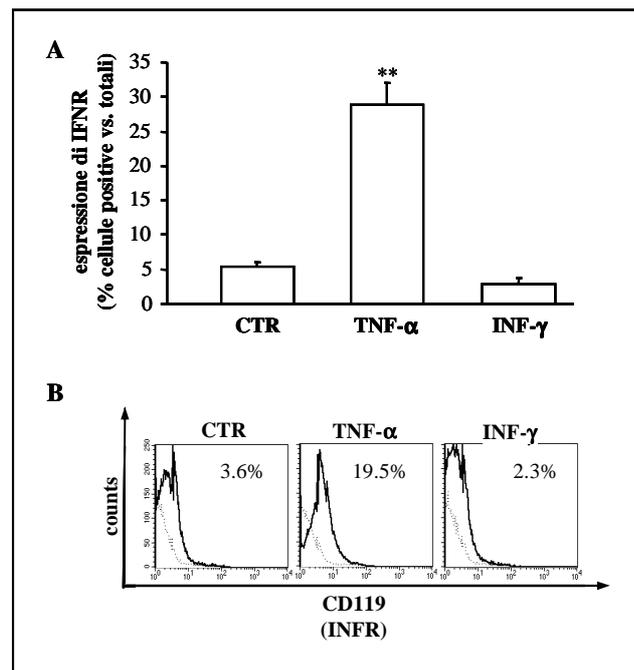
### 3. Studio dell'effetto sinergico di IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$

Per capire i meccanismi alla base della sinergia tra IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nei tireociti umani, è stato valutato se le due citochine fossero in grado di modulare in modo reciproco i loro recettori, meccanismo di interazione tra citochine già noto in letteratura. Tramite esperimenti di citofluorimetria e analisi Real-Time PCR, è stata valutata l'espressione di IFNR (o CD119, recettore per INF- $\gamma$ ) e di TNFR di tipo I e II (recettori per TNF- $\alpha$ ) nei tireociti stimolati per 24h con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml).

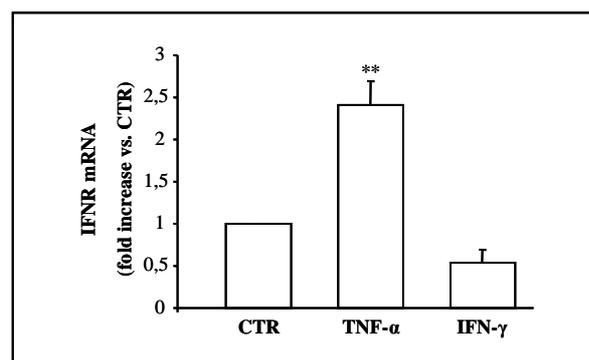
Dall'analisi citofluorimetrica risulta chiaro che l'espressione della proteina di membrana IFNR aumenta significativamente nei tireociti trattati con TNF- $\alpha$  rispetto all'espressione basale in cellule di controllo ( $28.82 \pm 3.11\%$  vs  $5.42 \pm 0.63\%$ , percentuale del numero di cellule positive rispetto al numero di cellule totali), mentre lo stimolo con IFN- $\gamma$  non determina nessun effetto significativo (Fig.6A).

Entrambi i recettori per il TNF- $\alpha$  non subiscono nessun tipo di modulazione da parte delle due citochine (dati non mostrati).

L'analisi dell'espressione dell'mRNA di IFNR rivela, in accordo con i risultati di citofluorimetria, un significativo aumento dell'espressione del gene del recettore indotto dallo stimolo di 24h del TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), sebbene sia molto più basso rispetto all'incremento del recettore a livello proteico, mentre IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) non esercita nessun effetto significativo (Fig.7).



**Fig.6 A.** L'analisi citofluorimetrica rivela che TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) up-regola l'espressione sulla membrana di IFNR, rispetto a cellule di controllo (\*\*P<0.01); il trattamento con il suo ligando (1000 U/ml) non mostra effetti significativi. **B.** Esperimento rappresentativo dell'espressione di membrana di IFNR (CD119) nei tireociti dopo 24h di trattamento. Negli istogrammi citofluorimetrici, la linea continua rappresenta la colorazione con Ab anti-IFNR, mentre la linea discontinua la colorazione con mAb di controllo isotipico. In ciascun pannello è indicato il trattamento effettuato e la percentuale di cellule positive rispetto alle cellule totali. I risultati derivano da 8 esperimenti utilizzando diverse preparazioni cellulari (n=8).



**Fig.7** L'analisi in Real-Time PCR dell'espressione di IFNR nei tireociti mostra che TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) aumenta significativamente la sua espressione (\*\*P<0.01 verso cellule di controllo), mentre IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) non esercita nessun effetto significativo. L'espressione dell'mRNA di IFNR è espressa come *fold increase* verso l'espressione in cellule di controllo, prese come 1. I dati sono espressi come media $\pm$ SE e derivano da 4 esperimenti separati utilizzando preparazioni cellulari distinte (n=4).

## 4. Azione di metimazolo, di rosiglitazone e di elocalcitolo sui tireociti umani

### 4.1. Effetto sulla secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine pro-infiammatorie

Per studiare il possibile ruolo svolto dai farmaci sulla secrezione di CXCL10 nei tireociti umani, indotta dalle citochine pro-infiammatorie, le cellule sono state stimolate per 24h con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) e TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) e concentrazioni crescenti dei farmaci:

- MMI: 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 ng/ml
- RGZ: 0.05, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30  $\mu$ M
- Elocalcitolo:  $10^{-13}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M

Le concentrazioni dei farmaci sono state scelte sulla base della dose terapeutica ed in accordo ai parametri farmacocinetici, come  $C_{MAX}$ , concentrazione massima nel plasma del farmaco dopo somministrazione, ed AUC, area sottesa dalla curva della concentrazione plasmatica del farmaco nel tempo (*Area Under the Curve*).

MMI è utilizzato per la terapia della malattia di Graves con una somministrazione orale giornaliera di 15 mg, raggiungendo una concentrazione plasmatica pari a 300 ng/ml ( $=2.63 \times 10^{-6}$  M) (Jansson *et al.* 1983; Okamura *et al.* 1986).

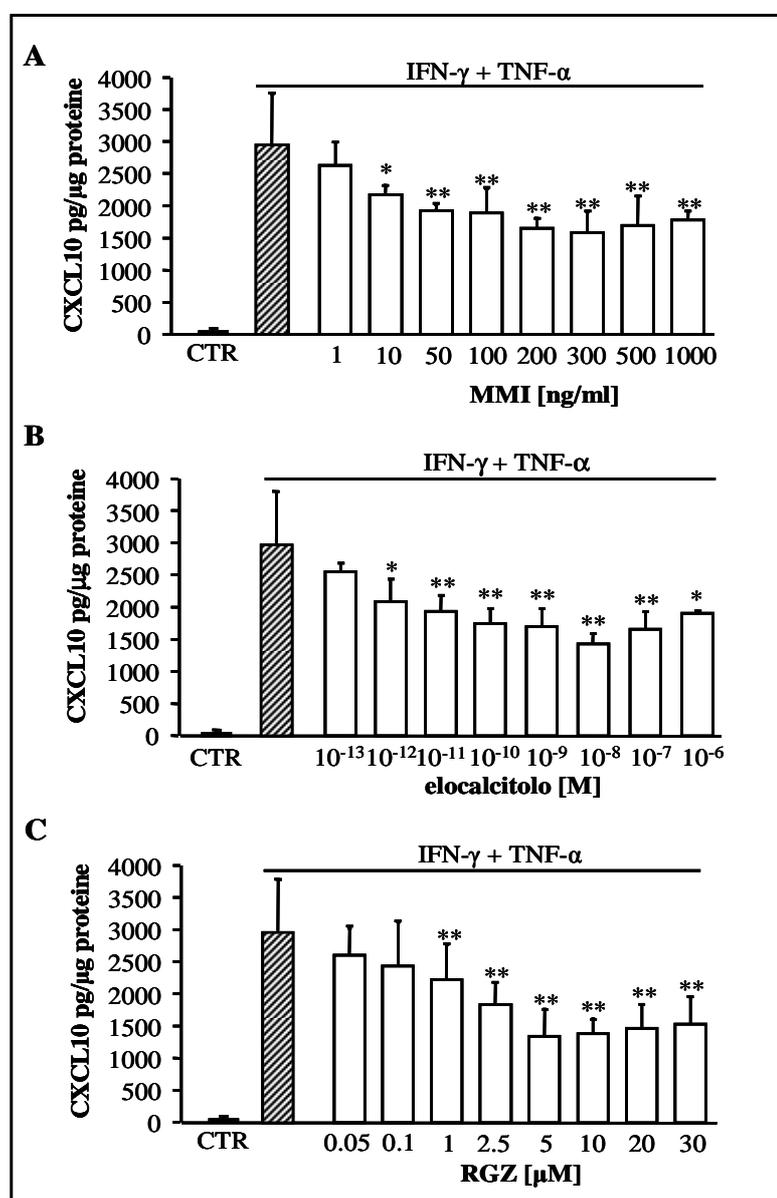
RGZ è utilizzato nella terapia antidiabetica 2-8 mg/die, raggiungendo una  $C_{MAX}$  pari a  $0.43-1.68 \times 10^{-6}$  M (Barman Balfour *et al.* 1999; Cox *et al.* 2000).

La dose terapeutica nel trattamento del BPH di elocalcitolo è 150  $\mu$ g al giorno per os, con una  $C_{MAX}$  pari a  $2.2-4.5 \times 10^{-8}$  M (Colli *et al.* 2006).

Come mostrato in Fig.8A MMI è in grado di diminuire la quantità di CXCL10 presente nel surnatante cellulare, indotta dalle citochine, in modo dose-dipendente e significativo a partire da 10 ng/ml. La massima inibizione ( $46.28 \pm 3.04\%$ ) è raggiunta con la concentrazione di 300 ng/ml di MMI.

In modo simile, elocalcitolo inibisce nei tireociti umani in modo dose-dipendente

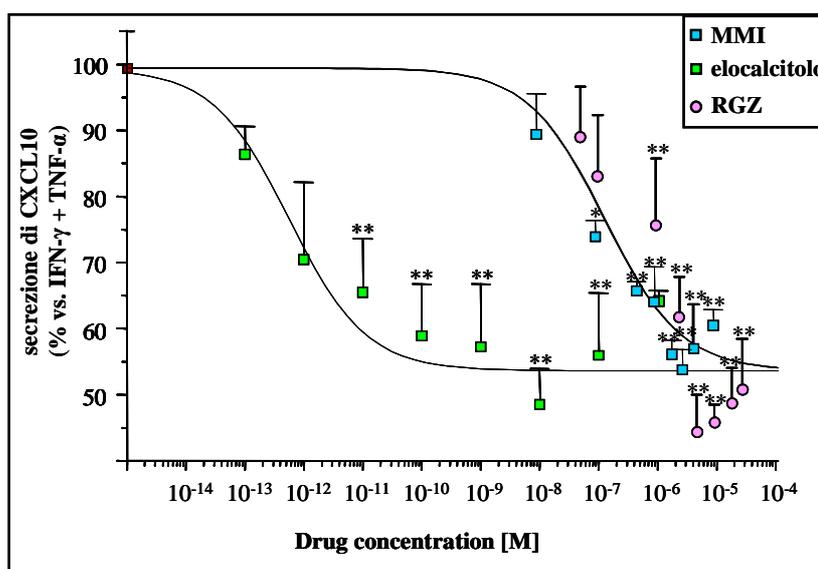
la secrezione proteica di CXCL10 in modo significativo a partire dalla concentrazione di  $10^{-11}$  M, con massima inibizione ( $51.51 \pm 5.4\%$ ) alla dose di  $10^{-8}$  M (Fig.8B).



**Fig.8 A.** Dosi crescenti di MMI diminuiscono la secrezione di CXCL10 (espressa come pg/μg proteine) indotta da IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) + TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  verso cellule trattate con IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ). **B.** Elocalcitolo inibisce in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  verso trattamento con IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ). **C.** Il trattamento dei tireociti con diverse concentrazioni di RGZ inibisce in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine (\*\* $P < 0.01$  verso IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ). I risultati delle curve dose-risposta sono espressi come media $\pm$ SE e derivano da 4-7 esperimenti separati usando distinte preparazioni cellulari (n=4-7).

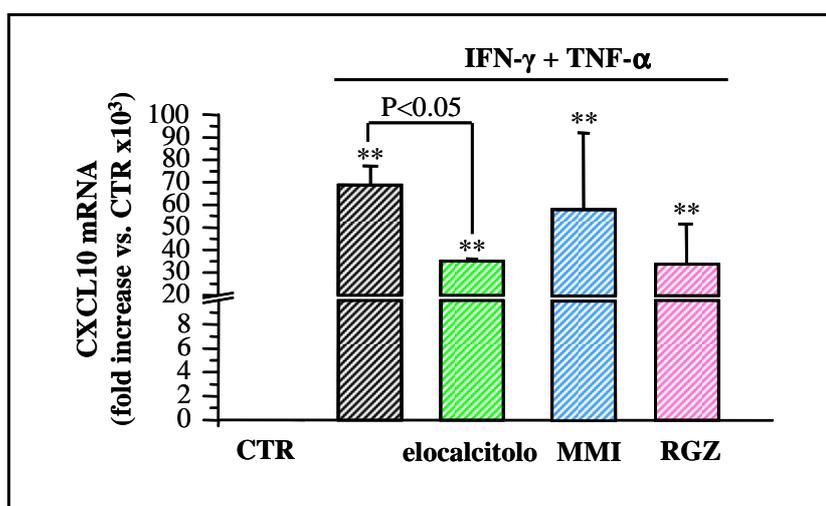
Anche RGZ inibisce significativamente in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10 (Fig.8C) a partire da 1  $\mu\text{M}$ , raggiungendo la massima inibizione ( $54.44\pm 5.34\%$ ) alla dose di 5  $\mu\text{M}$ .

Utilizzando il programma ALLFIT è stato fatto il *fitting* simultaneo delle curve di inibizione di MMI, di RGZ e di elocalcitolo. MMI e RGZ sono in grado di esercitare un effetto inibitorio comparabile non statisticamente significativo sulla secrezione di CXCL10. Non risulta una differenza significativa tra le dosi inibitorie 50 (*half maximal inhibitory concentration*,  $\text{IC}_{50}$ ) di MMI e di RGZ: la  $\text{IC}_{50}$  della curva di *fitting* è pari a  $0.29\pm 0.05 \mu\text{M}$  ( $P=0.21$ ). Il confronto tra elocalcitolo e MMI mostra una differenza statisticamente significativa tra le curve: la  $\text{IC}_{50}$  di elocalcitolo è pari a  $5.69\times 10^{-13}\pm 3.92 \times 10^{-13} \text{ M}$ , e quindi elocalcitolo risulta molto più potente di MMI (e quindi anche di RGZ) nell'inibire la secrezione di CXCL10 nei tireociti (Fig.9).



**Fig.9** Dopo interpolazione con ALLFIT delle curve d'inibizione risulta che MMI (quadrati azzurri) ed RGZ (cerchi rosa) esercitano un effetto simile nei tireociti umani, fittando la stessa curva con  $\text{IC}_{50}=0.29\pm 0.05 \mu\text{M}$  ( $P=0.21$ ), mentre elocalcitolo (quadrati verdi) esercita il suo effetto inibitorio con una potenza molto maggiore rispetto a MMI e RGZ ( $\text{IC}_{50}= 5.69\times 10^{-13}\pm 3.92 \times 10^{-13} \text{ M}$ ,  $P<0.01$ ). La secrezione di CXCL10 è espressa come variazione percentuale rispetto alla massima secrezione indotta dalla stimolazione con IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ .

L'analisi dell'espressione dell'mRNA di CXCL10 nei tireociti umani stimolati per 24h con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) + TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) ed in presenza dei farmaci alla dose a cui determinano la massima inibizione nella secrezione delle proteina (MMI: 300 ng/ml, RGZ: 5  $\mu$ M, Elocalcitolo:  $10^{-8}$  M), rivela che solamente elocalcitolo è in grado di inibire in modo statisticamente significativo l'espressione genica del CXCL10 indotta dallo stimolo citochinico (Fig.10).



**Fig.10** Elocalcitolo ( $10^{-8}$  M), ma non MMI (300 ng/ml) e RGZ (5  $\mu$ M), down-regola significativamente l'espressione dell'mRNA di CXCL10 indotta da IFN- $\gamma$  +TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$  verso cellule trattate con le citochine, \*\* $P < 0.01$  verso cellule di controllo). L'espressione dell'mRNA di CXCL10 è espressa come *fold increase* verso l'espressione in cellule di controllo, presa come 1. I dati sono espressi come *media*±SE e derivano da 3 esperimenti separati utilizzando preparazioni cellulari distinte ( $n=3$ ).

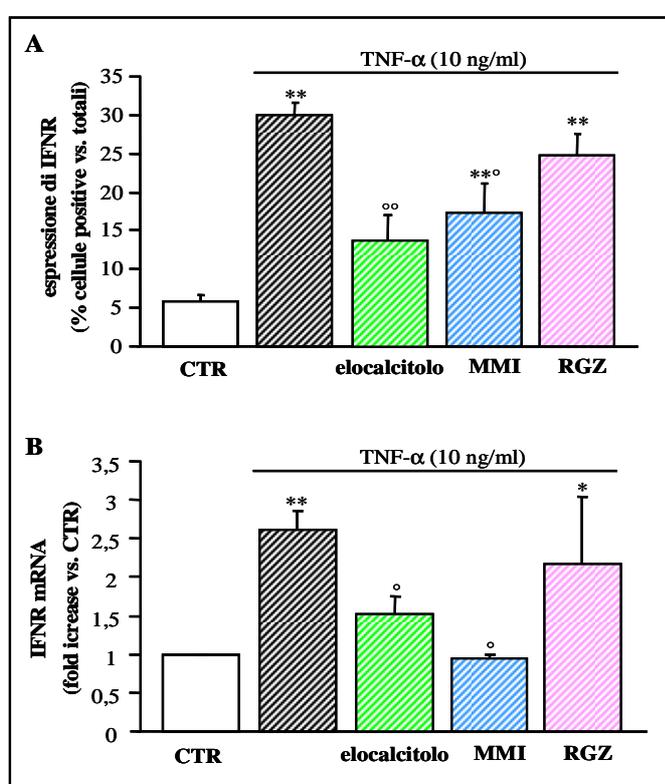
#### 4.2. Effetto sull'up-regolazione di IFNR indotta da TNF- $\alpha$

Per verificare se l'effetto dei farmaci sulla secrezione di CXCL10 influisca sul meccanismo di sinergia tra le due citochine, è stata analizzata l'espressione di IFNR indotta da TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) in presenza di MMI (300 ng/ml), RGZ (5  $\mu$ M) ed elocalcitolo ( $10^{-8}$  M).

L'analisi citofluorimetrica mostra come il trattamento dei tireociti con TNF- $\alpha$  ed elocalcitolo riduce in modo significativo l'espressione della proteina IFNR sulla

membrana cellulare ( $13.9\pm 3.2\%$  verso  $30.0\pm 1.5\%$  indotta da  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $P<0.01$ , Fig.11A). Anche il trattamento dei tireociti con MMI per 24h riduce significativamente l'espressione di IFNR up-regolata da  $\text{TNF-}\alpha$  ( $17.4\pm 3.8\%$  e  $30\pm 1.5\%$  rispettivamente), mentre RGZ ( $5\ \mu\text{M}$ ) non determina nessuna variazione di espressione significativa (Fig.11A).

Lo studio in Real-Time PCR dell'espressione dell'mRNA specifico conferma l'effetto inibitorio di elocalcitolo e di MMI, mentre RGZ non mostra alcun effetto modulatore (Fig.11B).



**Fig.11 A.** Sia elocalcitolo ( $10^{-8}$  M), che MMI (300 ng/ml), riducono in modo significativo l'espressione di IFNR up-regolata da  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml); al contrario, RGZ ( $5\ \mu\text{M}$ ) non esercita alcun effetto significativo nelle cellule trattate con  $\text{TNF-}\alpha$  ( $^{\circ}P<0.05$ ,  $^{\circ\circ}P<0.01$  verso espressione indotta da  $\text{TNF-}\alpha$ ;  $^{**}P<0.01$  verso cellule di controllo). I risultati sono espressi come  $\text{media}\pm\text{SE}$  della percentuale di cellule positive rispetto alle cellule totali. I risultati derivano da 4 esperimenti utilizzando diverse preparazioni cellulari ( $n=4$ ). **B.** L'analisi in Real-Time PCR rivela che elocalcitolo ( $10^{-8}$  M) e MMI (300 ng/ml), ma non RGZ ( $5\ \mu\text{M}$ ), inibiscono l'espressione dell'mRNA di IFNR indotta da  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml) ( $^{\circ}P<0.05$  verso espressione indotta da  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $^{*}P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$  verso controllo). L'espressione dell'mRNA di IFNR è espressa come *fold increase* verso l'espressione in cellule di controllo, presa come 1. I dati sono espressi come  $\text{media}\pm\text{SE}$  e derivano da 3 esperimenti separati utilizzando preparazioni cellulari distinte ( $n=3$ ).

### 4.3. Modulazione del *signaling* intracellulare delle citochine pro-infiammatorie

Le citochine pro-infiammatorie, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , utilizzano due principali vie di segnalazione intracellulare nella modulazione degli effetti infiammatori: la via di STAT-1 e la via di NF- $\kappa$ B, rispettivamente. Nei tireociti umani, dopo stimolazione citochinica, è stata valutata l'attivazione delle due vie di *signaling*, e l'eventuale modulazione indotta dalla contemporanea presenza dei farmaci in studio.

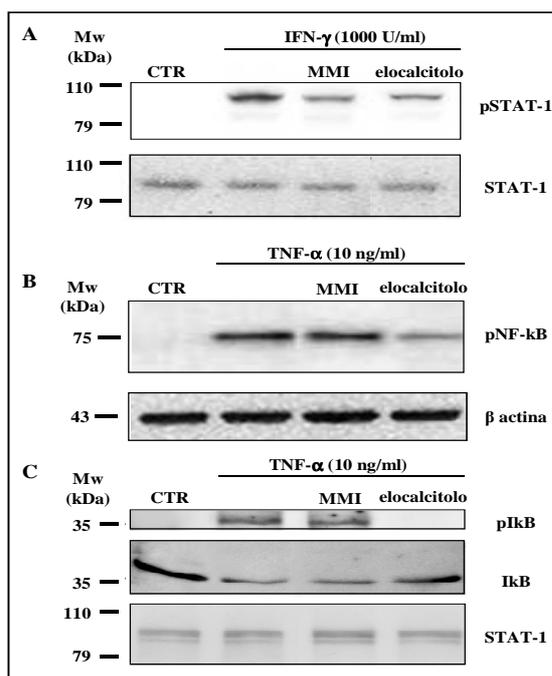
Mediante analisi Western blot è stato valutato lo stato di fosforilazione delle proteine STAT-1 (Fig.12A), NF- $\kappa$ B (Fig.12B), e I $\kappa$ B e (Fig.12C).

Le cellule tiroidee sono state stimulate per 15 min con IFN- $\gamma$  1000 U/ml o con TNF- $\alpha$  10 ng/ml in presenza o meno di elocalcitolo ( $10^{-8}$  M), MMI (300 ng/ml), e RGZ (5  $\mu$ M).

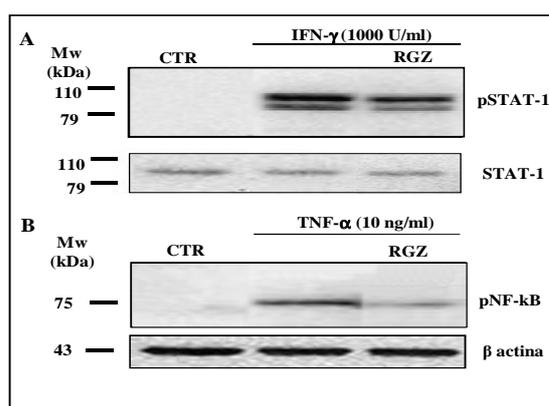
IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  inducono la rapida attivazione delle proprie specifiche vie di *signaling* nei tireociti umani, determinando, rispettivamente la fosforilazione di STAT-1 e di NF- $\kappa$ B (Fig.12A e B). L'attivazione di NF- $\kappa$ B è stata valutata anche indirettamente valutando I $\kappa$ B, repressore di NF- $\kappa$ B, che una volta fosforilato viene rapidamente ubiquitinato e degradato nel proteasoma, permettendo a NF- $\kappa$ B di attivarsi e traslocare nel nucleo: TNF- $\alpha$  è in grado di determinare la fosforilazione di I $\kappa$ B, ed inoltre, si osserva la degradazione di I $\kappa$ B (Fig.12C).

Per quanto riguarda i farmaci, elocalcitolo blocca sia la fosforilazione di STAT-1 indotta da IFN- $\gamma$ , sia quella di NF- $\kappa$ B e di I $\kappa$ B indotta da TNF- $\alpha$ ; MMI, invece, è in grado di agire soltanto sullo stato di fosforilazione di STAT-1, senza alterare il *pathway* NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B attivato da TNF- $\alpha$ .

RGZ invece down-regola la fosforilazione di NF- $\kappa$ B, ma non quella di STAT-1 (Fig.13).



**Fig.12** Gli estratti SDS di tireociti stimolati con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml, **A**) o con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, **B** e **C**) con o senza elocalcitolo ( $10^{-8}$  M) e MMI (300 ng/ml) sono stati immunoblottati con Abs specifici per determinare la fosforilazione di STAT-1 (**A**), NF- $\kappa$ B (**B**) e I $\kappa$ B (**C**). Il trattamento con IFN- $\gamma$  induce la fosforilazione di STAT-1, mentre TNF- $\alpha$  induce quella di NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B, e la degradazione di I $\kappa$ B. Elocalcitolo inibisce entrambi i *pathways* citochinici, bloccando la fosforilazione di STAT-1 e di NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B. MMI, invece, agisce solamente sulla via di STAT-1. STAT-1 (**A** e **C**) e  $\beta$ -actina (**B**) sono stati utilizzati come controlli per normalizzare il caricamento dei campioni. I risultati derivano da 4-6 esperimenti separati, utilizzando preparazioni cellulari distinte (n=4/6).



**Fig.13** RGZ inibisce solamente la via di NF- $\kappa$ B, bloccando la sua fosforilazione (**A**), mentre non modula il *pathway* di STAT-1 (**B**). STAT-1 e  $\beta$ -actina sono stati utilizzati come controlli per normalizzare il caricamento dei campioni. I risultati derivano da 4 esperimenti separati, utilizzando preparazioni cellulari distinte (n=4).

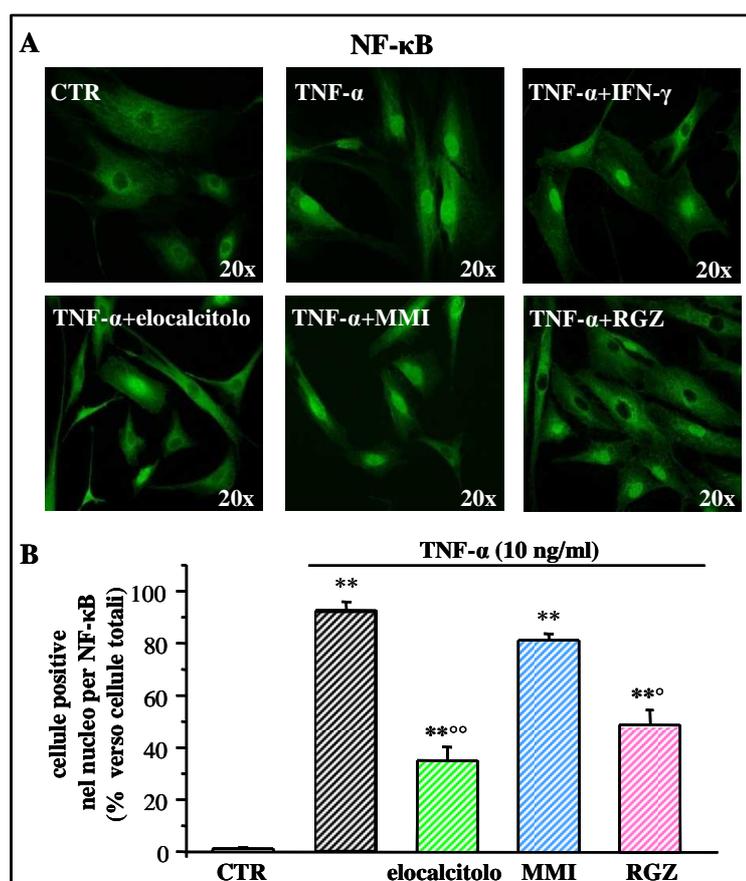
I risultati sull'attivazione della fosforilazione di STAT-1 e di NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B da parte di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , rispettivamente, e sulla modulazione da parte dei farmaci ottenuti con la tecnica di Western blot sono stati ulteriormente confermati una metodica diversa: un saggio di traslocazione nucleare effettuato con la microscopia ad immunofluorescenza.

In Fig.14 l'analisi con la microscopia ad immunofluorescenza con un anticorpo verso la subunità p65 di NF- $\kappa$ B in cellule tiroidee, trattate per 30 min con TNF- $\alpha$  da solo (10 ng/ml) o combinato con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml), mostra un aumento della fluorescenza nel nucleo, rispetto a cellule di controllo: lo *staining* nucleare con TNF- $\alpha$  è pari a  $91.42 \pm 2.13\%$ , quello con TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  è di  $89.82 \pm 2.48\%$ , mentre nelle cellule di controllo  $1.14 \pm 0.64\%$ . Quindi a seguito dello stimolo infiammatorio, si osserva un aumento della fosforilazione di NF- $\kappa$ B (subunità p65), della sua attivazione e traslocazione dal citoplasma al nucleo. IFN- $\gamma$  da solo non determina nessun effetto sull'attivazione/traslocazione di NF- $\kappa$ B (dati non mostrati).

Gli effetti dei farmaci nelle cellule stimulate con TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  sono risultati gli stessi rispetto agli esperimenti in cellule stimulate con TNF- $\alpha$  da solo; pertanto sono stati riportati soltanto i dati dei farmaci in presenza di TNF- $\alpha$ .

La co-incubazione con TNF- $\alpha$  e MMI (300 ng/ml) non influenza la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B ( $81.8 \pm 4.41\%$  di cellule positive nel nucleo). Al contrario, il trattamento simultaneo con elocalcitolo ( $10^{-8}$  M) e RGZ (5  $\mu$ M) riduce in modo statisticamente significativo la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B indotta dalla citochina: con elocalcitolo si ha una riduzione del numero di cellule con positività nel nucleo, e quindi della traslocazione, pari a circa il 60% (*staining* nucleare  $35.28 \pm 5.06\%$ ), mentre con il RGZ del 50%.

Nel pannello in basso di Fig.14 sono riportate i risultati di *staining* nucleare, ottenuti con tutti i trattamenti, espressi come percentuale di cellule positive nel nucleo. Questa percentuale è stata ottenuta classificando le cellule come positive o negative per la presenza di p65 nel nucleo, e poi contando il numero di cellule positive rispetto al numero totale in 18 campi separati del vetrino.

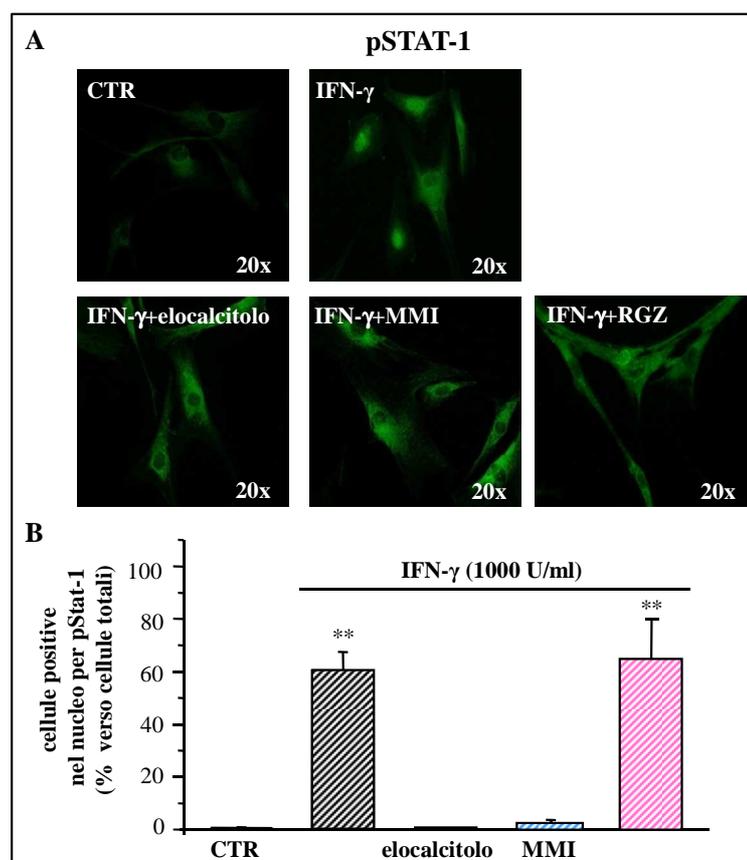


**Fig.14 A.** La stimolazione delle cellule tiroidee per 30 min sia con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) da solo, che combinato con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml), determina l'accumulo nucleare della subunità p65 di NF- $\kappa$ B nella maggior parte delle cellule, rispetto al controllo, in cui p65 è distribuita nel citosol cellulare. Nelle cellule stimolate con TNF- $\alpha$ , la presenza di elocalcitol e di RGZ determina una riduzione marcata della traslocazione nucleare di p65 (circa 60% e 50%, rispettivamente), mentre in presenza di TNF- $\alpha$  e MMI la distribuzione cellulare di p65 è simile a quella delle cellule stimolate soltanto con la citochina. Ingrandimento: 20x. **B.** Le colonne riassumono i risultati ottenuti sia con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) da solo, che combinato con i farmaci, espressi come percentuale di cellule positive per p65 nel nucleo (verso il numero di cellule totali) $\pm$ SE, e derivanti da 3 esperimenti separati utilizzando differenti preparazioni cellulari (n=3). (\*\*P<0.01 verso cellule di controllo; °P<0.05, °°P<0.01 verso trattamento con TNF- $\alpha$ ).

Per quanto riguarda la via di *signaling* di IFN- $\gamma$ , l'analisi con la microscopia ad immunofluorescenza con un anticorpo verso pSTAT-1 in cellule tiroidee conferma la capacità di IFN- $\gamma$  di attivare il fattore di trascrizione STAT-1, provocandone la fosforilazione e la traslocazione nel nucleo. La stimolazione dei tireociti per 30 min con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) risulta in un forte aumento delle cellule positive nel nucleo per pSTAT-1: lo *staining* nucleare per pSTAT-1 è

60.45±7.07%, mentre nelle cellule di controllo pSTAT-1 è virtualmente assente (0.58±0.4 %) (Fig.15).

La co-incubazione con IFN- $\gamma$  ed elocalcitolo ( $10^{-8}$  M) o MMI (300 ng/ml) determina un effetto simile: la traslocazione di pSTAT-1 viene bloccata quasi totalmente. Il trattamento con RGZ (5  $\mu$ M), in presenza di IFN- $\gamma$ , non determina nessuna variazione della localizzazione di pSTAT-1.



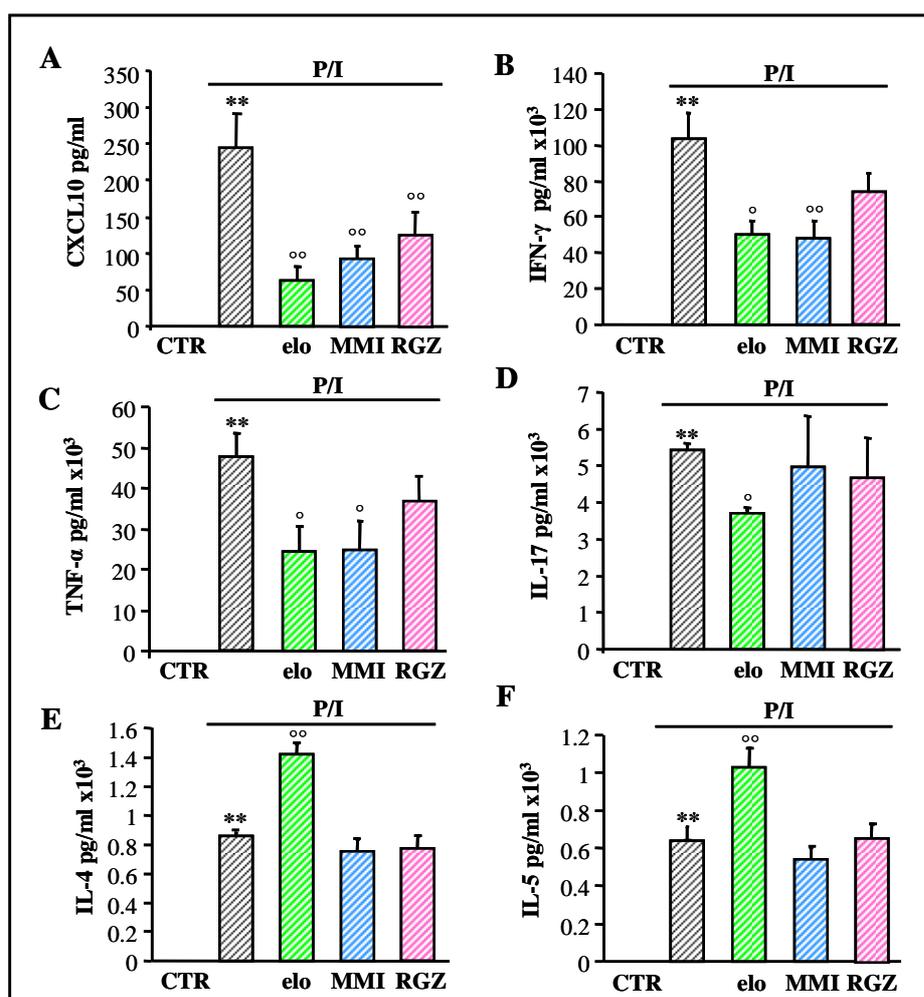
**Fig.15 A.** In cellule di controllo pSTAT-1 è virtualmente assente. Il trattamento con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) per 30 min induce l'accumulo di pSTAT-1 nel nucleo. Nelle cellule stimulate con IFN- $\gamma$  ed elocalcitolo ( $10^{-8}$  M) o MMI (300 ng/ml) la traslocazione nucleare di pSTAT-1 viene inibita, mentre con IFN- $\gamma$  e RGZ (5  $\mu$ M), non avviene nessuna variazione della localizzazione di pSTAT-1. Ingrandimento: 20x. **B.** Le cellule sono state classificate come positive o negative per la presenza di pSTAT-1 nel nucleo, ed i risultati sono espressi come percentuale di cellule positive $\pm$ SE (calcolate contando il numero di cellule positive rispetto al numero totale in 15 campi separate di ogni vetrino). I risultati sono espressi come media $\pm$ SE, e derivano da 3 esperimenti separati utilizzando differenti preparazioni cellulari (n=3). (\*\*P<0.01 verso cellule di controllo; °P<0.01 verso trattamento con IFN- $\gamma$ ).

## 5. Azione di elocalcitolo, di MMI e di RGZ sui linfociti CD4+ umani

Dopo 48h di trattamento con P/I (1  $\mu$ M/10 ng/ml) dei linfociti umani T CD4+ purificati, è stata valutata con una serie di dosaggi ELISA la secrezione di differenti citochine. I linfociti T CD4+ sotto stimolo con P/I sono in grado di secernere vari tipi di citochine in grandi quantità (Fig.16), rispetto ai valori non misurabili della condizione di controllo, in cui le cellule non sono state stimolate:

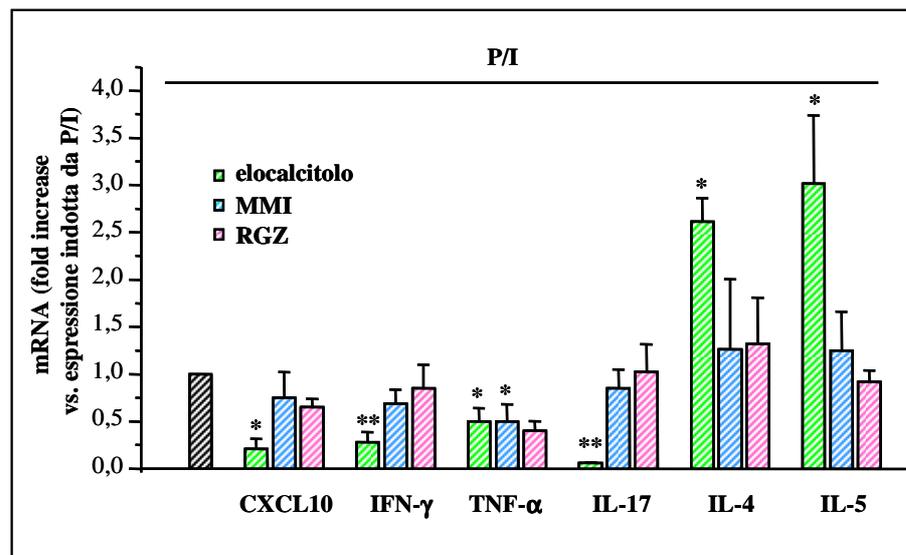
- CXCL10 (244.54 $\pm$ 46.67 pg/ml),
- IFN- $\gamma$  (103558.11 $\pm$ 14294.40 pg/ml),
- TNF- $\alpha$  (50920.56 $\pm$ 6203.17 pg/ml)
- IL-17 (5418.58 $\pm$ 151.40 pg/ml)
- IL-4 (859.83 $\pm$ 22.34 pg/ml)
- IL-5 (568.78 $\pm$ 66.32 pg/ml)

La co-incubazione con elocalcitolo ( $10^{-8}$  M) e con MMI (300 ng/ml) determina una riduzione significativa della secrezione da parte delle cellule T CD4+ di CXCL10 (elocalcitolo: 62.33 $\pm$ 18.80 pg/ml, MMI: 92.06 $\pm$ 17.96 pg/ml), di IFN- $\gamma$  (elocalcitolo: 50326.39 $\pm$ 6918 pg/ml, MMI: 48140.49 $\pm$ 9490 pg/ml), e di TNF- $\alpha$  (elocalcitolo: 24400.14 $\pm$ 6087.76 pg/ml, MMI: 24973.81 $\pm$ 7256.25 pg/ml) (Fig.16A, B, C). Come mostrato in Fig.16D, elocalcitolo riduce significativamente anche la secrezione di IL-17 (3704.13 $\pm$ 88.5 pg/ml), ed aumenta in modo significativo la produzione di IL-4 (1421.20 $\pm$ 69.77 pg/ml) e di IL-5 (1028.11 $\pm$ 101.00 pg/ml) da parte dei linfociti T CD4+ attivati con P/I (Fig.16E, F). MMI non determina alcun effetto sulla secrezione di IL-17, e non modifica la secrezione del pattern citochinico di tipo Th2 (Fig.16D, E, F). Il trattamento dei linfociti T CD4+ con RGZ (5  $\mu$ M) determina una riduzione statisticamente significativa di CXCL10 (116.41 $\pm$ 12.95 pg/ml), e non significativa di IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ , mentre non ha effetti su IL-17 e sulle citochine Th2 (Fig.16).



**Fig.16 A-F.** I linfociti T CD4<sup>+</sup> stimolati per 48h con P/I (1  $\mu$ M/10 ng/ml) sono in grado di secernere CXCL10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-4, IL-5 (\*\*P<0.01 verso cellule di controllo non stimolate). Il trattamento simultaneo con elocalcitolo (10<sup>-8</sup> M) riduce la quantità di CXCL10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e aumenta IL-4, IL-5 (°P<0.05, °°P<0.01 verso secrezione indotta da P/I). La co-incubazione con P/I e MMI (300 ng/ml) determina una riduzione significativa di CXCL10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , ma non esercita alcun effetto sulla secrezione di IL-17, IL-4, IL-5 (°P<0.05, °°P<0.01 verso secrezione indotta da P/I). RGZ (5  $\mu$ M) determina la riduzione significativa di CXCL10, tende a diminuire IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ , ma non esercita alcun effetto sulla secrezione delle altre citochine (°°P<0.01 verso secrezione indotta da P/I). La secrezione proteica è espressa come pg/ml. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SE e derivano da 6 esperimenti effettuati con diverse preparazioni cellulari ottenute da donatori diversi (n=6).

L'analisi dell'espressione dell'mRNA con Real-time PCR conferma il profilo delle citochine secrete dai linfociti stimolati per 48h con P/I, ottenuto dai dosaggi ELISA (Fig.17), ed inoltre conferma l'azione dei diversi farmaci.



**Fig.17** Nel grafico è riportata l'espressione degli specifici mRNA (*fold increase* verso espressione indotta da P/I, presa come 1) nelle cellule T CD4+ sotto differenti trattamenti farmacologici. Le colonne esprimono la media $\pm$ SE ed i risultati derivano da 4 esperimenti separati usando preparazioni cellulari diverse (n=4)

## DISCUSSIONE

Graves' disease (GD) è una malattia autoimmune della tiroide, caratterizzata dalla presenza di auto-anticorpi (TRAb), che si legano ai recettori per il TSH sulle cellule follicolari tiroidee causando ipertiroidismo. GD è inoltre caratterizzata da reattività verso gli antigeni tiroidei *self* e da un'importante infiltrazione linfocitaria persistente nella ghiandola, che svolge un ruolo importante nella patogenesi della malattia (Weetman AP. 1994).

Nelle AIDT le cellule T infiltranti ed i macrofagi mediano importanti effetti infiammatori, come il rilascio di citochine (Weetman *et al.* 1997), tra cui IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Recentemente, è stato dimostrato che il fenotipo delle cellule T coinvolte nel GD cambia nel corso della malattia, il sottotipo predominante nei pazienti con durata breve è quello Th1, mentre i cloni di cellule T derivanti da pazienti con una durata più lunga della malattia mostrano principalmente il fenotipo Th2 (Aniszewski *et al.* 2000).

La risposta infiammatoria è un processo multisteps, caratterizzato da differenti citochine e chemochine, il cui equilibrio determina il dominio della popolazione linfocitaria di tipo Th1 o di quella di tipo Th2. Il primo subset di linfociti, che secerne IFN- $\gamma$  e IL-2, predomina nelle risposte infiammatorie, mentre i linfociti Th2, che secernono IL-4 e IL-5, sono coinvolti nell'immunità umorale. Dato che le due subpopolazioni tendono a funzionare in modo antagonista tra loro, il bilanciamento tra i linfociti Th1 e Th2 può determinare il successo nelle malattie autoimmuni, in termini di protezione e d'immunopatologia.

Inoltre le cellule follicolari tiroidee stesse producono molte citochine e chemochine (Antonelli *et al.* 2006b; Antonelli *et al.* 2006d; Antonelli *et al.* 2009; Garcìa-Lòpez *et al.* 2001; Watson *et al.* 1995), che controllano il reclutamento dei linfociti, fenomeno complesso che prevede l'aderenza e la migrazione attraverso l'endotelio, il *trafficking* attraverso l'interstizio, il movimento verso i tireociti nel

sito dell'inflammatione e infine la localizzazione *in situ*.

Tra le chemochine CXCL10, membro della famiglia delle CXC chemochine indotte da IFN- $\gamma$ , è stato recentemente identificato come fondamentale nella patogenesi dell'autoimmunità ghiandolare (Rotondi *et al.* 2003). Essa svolge un ruolo importante nelle fasi iniziali dei disordini autoimmuni tiroidei, in quanto alti livelli di CXCL10 sono presenti in pazienti con fase iniziale di GD (Antonelli *et al.* 2004; Romagnani P. *et al.* 2002b).

CXCL10 è in grado di promuovere la risposta infiammatoria di tipo Th1, guidando il reclutamento linfocitario, la proliferazione delle cellule T e la secrezione di IFN- $\gamma$  (Campbell JD *et al.* 2004; Romagnani P. *et al.* 2004). Si instaura un loop positivo tra i linfociti Th1 esprimenti CXCR3, reclutati nei siti dell'inflammatione e le cellule tiroidee follicolari, stimulate dall'IFN- $\gamma$  prodotto dalle cellule T (Rotondi *et al.* 2007).

I risultati della ricerca mostrano che i tireociti umani in coltura, isolati dal parenchima internodulare di tessuti tiroidei sani di pazienti sottoposti a intervento chirurgico per gozzo tiroideo (aumento del volume ghiandolare senza presenza d'ipertiroidismo), stimolati con citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) secernono la chemochina CXCL10.

Non sono stati utilizzati i tessuti provenienti da pazienti affetti da GD, poiché tali pazienti al momento dell'intervento chirurgico devono essere eutiroidei, poiché sono stati sottoposti al trattamento terapeutico con farmaci antitiroidei.

Dosi crescenti di IFN- $\gamma$  inducono una secrezione marcata di CXCL10 dose-dipendente da parte dei tireociti e che non raggiunge un plateau, mentre il TNF- $\alpha$ , a differenza di precedenti studi effettuati nei tireociti umani (Antonelli *et al.* 2006d; Garcìa-Lòpez *et al.* 2001), in cui non veniva evocata nessuna risposta, è in grado di determinare in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10, sebbene in quantità più basse rispetto a IFN- $\gamma$  e raggiungendo un plateau.

Inoltre, TNF- $\alpha$  è in grado di up-regolare l'mRNA di CXCL10 in modo simile a IFN- $\gamma$ , suggerendo che TNF- $\alpha$  possa contribuire a iniziare il reclutamento dei Th1 nel sito dell'inflammatione.

La combinazione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  determina un effetto sinergico, sia sulla secrezione proteica sia sull'espressione genica di CXCL10.

Il sinergismo tra le due citochine è stato descritto in molti sistemi biologici: in particolare, la presenza concomitante nel sito dell'infiammazione di IFN- $\gamma$  e di TNF- $\alpha$  è essenziale nell'orchestrare e amplificare la risposta cellulare di tipo infiammatorio (Krakauer *et al.* 1993; Lombardi *et al.* 2009). Numerosi studi hanno osservato che TNF- $\alpha$  è in grado di sinergizzare con IFN- $\gamma$  nell'indurre l'espressione dell'mRNA di CXCL10 (Sauty *et al.* 1999) e che TNF- $\alpha$  aumenta la produzione di CXCL10 indotta da IFN- $\gamma$  in differenti tipi di cellule umane, come cellule della corteccia surrenalica (Rotondi *et al.* 2005), cellule endoteliali di microcircolo (Lombardi *et al.* 2009), cardiomiociti (Crescioli *et al.* 2008), cellule mesangiali (Romagnani P. *et al.* 2002a). Sono molti i meccanismi con cui la sinergia citochinica può attuarsi: la modulazione dell'espressione del recettore di una citochina da parte dell'altra, la regolazione dell'affinità di una citochina per il proprio recettore, oppure la variazione dell'espressione genica dell'altra citochina attraverso alterazione della trascrizione, della stabilità dell'mRNA o della sintesi proteica (Holter *et al.* 1986; Zuckerman *et al.* 1988).

I risultati mostrano che nei tireociti l'effetto sinergico è associato a un'up-regolazione significativa di IFNR, guidata da TNF- $\alpha$ , sia a livello proteico che genico. Numerose citochine, compreso TNF- $\alpha$ , riescono ad amplificare le loro risposte biologiche sia *in vitro* sia *in vivo* attraverso la regolazione dell'espressione dei recettori per altre citochine (Krakauer *et al.* 1993). In particolare, questo meccanismo di up-regolazione del reciproco recettore tra TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  è stato descritto anche in altri tipi cellulari (Crescioli *et al.* 2008; Lombardi *et al.* 2009; Ruggiero *et al.* 1986; Sanceau *et al.* 1992; Shirey *et al.* 2006). L'up-regolazione dei recettori per le citochine potrebbe rendere le cellule più sensibili agli stimoli, facilitando l'amplificazione delle risposte infiammatorie (Shirey *et al.* 2006). La ricerca dimostra chiaramente che TNF- $\alpha$  up-regola l'espressione di IFNR, sia a livello proteico sia genico, mentre nessun tipo di effetto da parte delle due citochine è stato osservato sull'espressione di TNFR1 e TNFR2 (dati non mostrati).

Livelli plasmatici elevati di TNF- $\alpha$  e del suo recettore solubile (sTNFR-I), sono stati implicati nei meccanismi citotossici che caratterizzano la distruzione della ghiandola tiroidea nelle AITD (Díez *et al.* 2002). Come mostrato nei risultati, sia

TNF- $\alpha$  che IFN- $\gamma$  stimolano i tireociti a secernere CXCL10 in modo dose-dipendente, e TNF- $\alpha$  è capace di sinergizzare con IFN- $\gamma$  determinando un notevole aumento della risposta (la quantità di CXCL10 secreto passa infatti da pg/ml a ng/ml), in quanto, aumentando l'espressione di membrana di IFNR, rende le cellule più sensibili agli stimoli e in grado di rispondere a concentrazioni più basse di IFN- $\gamma$ . Inoltre in presenza di TNF- $\alpha$  la curva dose-risposta di IFN- $\gamma$  raggiunge il plateau, a differenza della curva dose-risposta di IFN- $\gamma$  da solo: questo fenomeno può essere spiegato dal fatto che TNF- $\alpha$  è in grado di aumentare notevolmente l'espressione di membrana di IFNR, raggiungendo una risposta a IFN- $\gamma$  che è già massima anche a concentrazioni di IFN- $\gamma$  basse. TNF- $\alpha$  sembra avere quindi un ruolo critico nella patogenesi delle AITD e in generale delle malattie autoimmuni, in accordo con studi precedenti che mettono in luce la rilevanza del *pathway* di TNF- $\alpha$  nel GD (Diez *et al.* 2002).

Nei tireociti umani è stata dimostrata la segnalazione intracellulare delle due citochine infiammatorie, tramite analisi di Western blot e saggi di traslocazione nucleare. IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) è in grado di attivare la via di STAT-1, provocandone la fosforilazione e quindi la traslocazione nel nucleo, dove andrà a regolare la trascrizione di specifici geni target. TNF- $\alpha$ , invece, agisce attivando la via di NF- $\kappa$ B: la stimolazione dei tireociti con TNF- $\alpha$  10 ng/ml determina la fosforilazione del fattore di trascrizione e della sua subunità inibitoria (I $\kappa$ B), che si stacca da NF- $\kappa$ B per essere poi degradato (come si osserva dall'analisi Western blot) e rende attivo NF- $\kappa$ B, libero di traslocare nel nucleo. Il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B svolge un ruolo cruciale nella regolazione di numerosi geni coinvolti nella risposta infiammatoria, in particolare di quelli codificanti per chemochine e citochine pro-infiammatorie e che controllano la morte cellulare (Li Q. *et al.* 2002).

La produzione di citochine nei disordini autoimmuni della tiroide è sostenuta dai tireociti, dai linfociti infiltranti la ghiandola e dall'attivazione di reazioni umorali in siti diversi dalla tiroide. I risultati mostrano che le stesse cellule follicolari tiroidee sono un sito importante di produzione di CXCL10 (Antonelli *et al.* 2004; Kemp *et al.* 2003; Garcia-Lopez *et al.* 2001; Romagnani P. *et al.* 2002b), in accordo con recenti studi effettuati in pazienti affetti da GD, che mostravano una

significativa riduzione degli alti livelli di CXCL10 nel siero dopo tiroidectomia (Antonelli *et al.* 2006b) o dopo trattamento con <sup>131</sup>I (Antonelli *et al.* 2007). Ciò suggerisce che le cellule follicolari tiroidee possono modulare la risposta autoimmune nelle AIDT attraverso la produzione di CXCL10 e perpetuare così la cascata autoimmune mediata dai linfociti Th1-CXCR3+ (El-Sawy *et al.* 2002; Rotondi *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2002).

L'interferenza con la produzione di CXCL10 o l'espressione di CXCR3 potrebbe risultare in una significativa inibizione del processo infiammatorio (Lazzeri *et al.* 2005a). Neutralizzando l'attività *in vivo* di CXCL10, ad esempio con anticorpi monoclonali anti-CXCL10, potrebbe essere possibile ottenere una polarizzazione pro-Th2, alterando il bilancio Th1/Th2 dovuto, almeno in parte, ad un effetto diretto di CXCL10 sulla polarizzazione delle cellule T verso il subset Th1 (Salomon *et al.* 2002).

In seguito all'osservazione della presenza di alti livelli sierici di CXCL10 in pazienti affetti da GD, molti trials clinici sono stati disegnati per valutare lo stato della chemochina nel siero nei pazienti di GD in relazione alla loro funzione tiroidea ed al trattamento (Antonelli *et al.* 2006a; Antonelli *et al.* 2006b; Antonelli *et al.* 2006c). I pazienti di GD con ipertiroidismo non trattato hanno livelli sierici di CXCL10 più alti dei pazienti ipertiroidei o eutiroidei sotto trattamento con MMI. Il trattamento delle AIDT con le tionamidi, oltre agli effetti sulla sintesi ormonale, è accompagnato a una graduale remissione dell'aberrazione autoimmune nella maggior parte dei pazienti (Laurberg P. 2006; Mc Gregor *et al.* 1980; Pinchera *et al.* 1969). La riduzione del CXCL10 dopo la somministrazione di MMI potrebbe essere dovuta agli effetti immunomodulatori del farmaco, in funzione anche del fatto che i livelli più bassi della chemochina sono associati con un più basso grado di infiltrazione dopo il trattamento farmacologico antitiroideo (Antonelli *et al.* 2006c).

Nel nostro modello *in vitro* di tireociti umani, MMI è in grado di diminuire la secrezione di CXCL10 indotta dalla citochine pro-infiammatorie, attraverso la down-regolazione dell'espressione di IFNR sulla membrana indotta da TNF- $\alpha$ , sia a livello proteico che genico. Questi risultati confermano le proprietà immunomodulatorie che MMI esercita sulle cellule follicolari tiroidee e non

sorprendono, in quanto è noto che MMI si concentra nelle cellule follicolari tiroidee e non nel tessuto interstiziale circostante, in cui sono presenti le cellule immunocompetenti infiltranti (Marchant *et al.* 1972).

L'ipertiroidismo di *per sé* gioca un ruolo minimo nel determinare i livelli di CXCL10 nel sangue, che invece sono fortemente associati con il processo autoimmune della fase ipertiroidea del GD (Antonelli *et al.* 2006°; Romagnani P. *et al.* 2002b), ma non con il gozzo tossico nodulare (Antonelli *et al.* 2007). Perciò, MMI assume importanza nella terapia anti-tiroidea, in quanto è in grado di restaurare lo stato eutiroideo e diminuisce il rilascio di CXCL10 nei tireociti.

Per capire quali vie di segnalazione intracellulari utilizzate dalle citochine infiammatorie fossero modulate da MMI, sono stati fatti esperimenti di Western blot e di immunocitochimica. I risultati mostrano che MMI è in grado di inibire la fosforilazione e la traslocazione di STAT-1, fattore di trascrizione attivato da IFN- $\gamma$ , e ha effetti sulla via di NF- $\kappa$ B attivata da TNF- $\alpha$ .

Oltre a studiare gli effetti del MMI nel modello di tireociti umani, sono stati presi in esame altri due farmaci dei quali numerosi studi hanno messo in luce proprietà anti-infiammatorie e immunomodulatorie: rosiglitazone (RGZ), farmaco antidiabetico agonista sintetico di PPAR $\gamma$  appartenente alla classe dei TZD ed elocalcitololo, agonista di VDR analogo non ipercalcemico della vitamina D.

Sebbene sia implicato nel differenziamento adipocitario e nell'omeostasi del glucosio (Santini *et al.* 2004), PPAR $\gamma$  è stato recentemente coinvolto nella modulazione dei processi infiammatori. La presenza di PPAR $\gamma$  è stata dimostrata nel tessuto tiroideo (Kasai *et al.* 2000) e nel tessuto orbitale dell'oftalmopatia di Graves (Mimura *et al.* 2003).

Recentemente è stato dimostrato che RGZ riduce i livelli di CXCL10 in cellule follicolari tiroidee, in fibroblasti retrobulbari e preadipociti derivanti da pazienti affetti da GO (Antonelli *et al.* 2006d). Gli agonisti di PPAR $\gamma$  svolgono un ruolo inibitorio nella self-perpetuazione dei processi infiammatori mediati dalle chemochine in diversi tipi cellulari umani (Antonelli *et al.* 2006d; Gosset *et al.* 2001; Lombardi *et al.* 2008; Lombardi *et al.* 2009; Marx *et al.* 2000; Su *et al.* 1999).

RGZ esercita effetti inibitori sulla secrezione di CXCL10 nei tireociti indotta da

IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ , senza modificare l'espressione del recettore per IFN- $\gamma$  modulata da TNF- $\alpha$ . Nei tireociti umani, RGZ inibisce in modo significativo la secrezione di CXCL10 a concentrazioni micromolari inibendo l'attivazione di NF- $\kappa$ B, come dimostra la diminuzione della traslocazione di NF- $\kappa$ B e l'inibizione della sua fosforilazione, indotte da TNF- $\alpha$ .

Al contrario, in altri modelli cellulari, come cellule di colon trasfettate con un NF- $\kappa$ B (Schaefer *et al.* 2005) o HMEC-1 (Lombardi *et al.* 2008), il meccanismo della riduzione della secrezione di CXCL10 indotto dagli agonisti di PPAR $\gamma$  sembra essere parzialmente indipendente da NF- $\kappa$ B. Inoltre, mentre alcuni autori (Antonelli *et al.* 2006d) hanno suggerito gli effetti anti-infiammatori benefici di RGZ nel GD, ci sono evidenze sperimentali e cliniche che gli agonisti di PPAR $\gamma$  bloccano il decorso clinico dell'oftalmopatia di Graves attraverso la stimolazione dell'adipogenesi (Starkey *et al.* 2003; Valyasevi *et al.* 2002).

Recentemente, Nissen e Wolsky (Nissen *et al.* 2007) hanno condotto una meta-analisi sull'utilizzo di RGZ, concludendo che l'uso di RGZ è associato con un aumentato rischio cardiovascolare nei pazienti affetti da diabete. Dalle conclusioni di questo lavoro è emerso un dibattito scientifico sul potenziale rischio cardiovascolare associato a RGZ, soprattutto riguardo alla scelta degli autori sul tipo di analisi di validazione dei dati effettuata e sui trials considerati per la meta-analisi. Utilizzando metodi statistici alternativi, Diamond *et al.* (Diamond *et al.* 2007) hanno rianalizzato gli stessi trials di Nissen e Wolsky bocciando l'associazione tra l'uso di RGZ e l'aumentato rischio di infarto del miocardio e morte per cause cardiovascolari. Anche i risultati del trial DREAM (*Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication*) (Bosch *et al.* 2006) e quelli del trial ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) indicano che l'uso di RGZ non è associato con un rischio aumentato per eventi ischemici cardiovascolari (Ajjan *et al.* 2008). Risultati definitivi sono tuttavia ancora lontani, anche a causa della potenziale inesattezza degli studi sperimentali e delle meta-analisi condotti finora (Lombardi *et al.* 2008).

Effetti benefici in molti modelli di malattie autoimmuni sono stati osservati anche con l'utilizzo degli agonisti di VDR (Adorini L. 2005b). Infatti, la forma attiva della vitamina D, 1,25(OH) $_2$ D $_3$  ed i suoi analoghi non ipercalcemici, attraverso il

VDR, oltre a regolare la crescita e la differenziazione di molti tipi cellulari, presentano pronunciate proprietà anti-infiammatorie ed immunoregolatorie (Adorini *et al.* 2007a). Attualmente, gli agonisti di VDR sono utilizzati nel trattamento topico della psoriasi, malattia autoimmune della pelle mediata dalle cellule Th1 (Pinette *et al.* 2003), ma i recenti progressi nella comprensione dei meccanismi immunomodulatori suggeriscono una applicazione più ampia nel trattamento delle malattie autoimmuni. In particolare, le proprietà anti-infiammatorie di elocalcitolo, analogo non ipercalcemico attualmente in studio in un trial in fase clinica II per il trattamento dell'iperplasia prostatica benigna (Crescioli *et al.* 2004), sono state recentemente dimostrate in un modello sperimentale di prostatite autoimmune (Adorini *et al.* 2007b).

Per quanto riguarda la tiroide, è stato dimostrato che il metabolita attivo della vitamina D previene le tiroiditi sperimentali autoimmuni (*experimental autoimmune thyroiditis*, EAT) in modelli animali (Ramos-Lopez *et al.* 2005) e che la combinazione di basse dosi di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e di CsA è in grado di prevenire EAT con un effetto sinergico (Chen *et al.* 2002; Fournier *et al.* 1990).

Nel modello di tireociti umani, elocalcitolo è in grado di interrompere il loop infiammatorio impedendo la produzione di CXCL10 indotta da IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , attraverso la modulazione di differenti *pathways* intracellulari. Elocalcitolo riduce l'espressione dell'mRNA di CXCL10 indotta dalle citochine pro-infiammatorie in modo statisticamente significativo, blocca la sinergia tra IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , in quanto down-regola l'espressione proteica e genica di IFNR indotta da TNF- $\alpha$  ed inoltre inibisce i *pathway* di entrambe le citochine. Elocalcitolo è in grado di bloccare l'attivazione di STAT-1 indotta da IFN- $\gamma$ : un cross talk tra STAT-1, attivato da IFN- $\gamma$ , e VDR, attivato da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , è stato descritto nelle cellule immunitarie, benché con effetti opposti (Matsuzaki *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2002). Elocalcitolo inibisce la traslocazione nucleare NF- $\kappa$ B promossa da TNF- $\alpha$ , in linea con dati precedenti ottenuti con agonisti di VDR nelle cellule derivanti da isole pancreatiche di topo NOD, che spontaneamente sviluppa diabete di tipo I (Giarratana *et al.* 2004) ed in DC mieloidi (Penna *et al.* 2007).

Le concentrazioni dei farmaci utilizzate negli esperimenti sono state selezionate in accordo ai parametri farmacocinetici, come  $C_{\text{MAX}}$  e AUC, raggiunti dopo

somministrazione della dose terapeutica.

È interessante notare che tutti e tre i farmaci, MMI, RGZ ed elocalcitolo, testati nei tireociti umani, sono in grado di diminuire, in modo dose-dipendente, la secrezione del CXCL10 indotta dalle citochine pro-infiammatorie, ma con potenza farmacologica molto diversa. MMI e RGZ presentano la stessa  $IC_{50}$ , pari a  $0.29 \times 10^{-6} \pm 0.05 \times 10^{-6}$  M, mentre elocalcitolo diminuisce la secrezione di CXCL10 indotta da  $IFN-\gamma + TNF-\alpha$  con una  $IC_{50}$  pari a  $5.69 \times 10^{-13} \pm 3.92 \times 10^{-13}$  M, ovvero con potenza molto maggiore rispetto a MMI/RGZ. La diversa potenza farmacologica sull'inibizione della risposta infiammatoria di tipo Th1, che i tre farmaci esercitano nei tireociti umani, può essere spiegata dal fatto che i farmaci hanno diversi meccanismi d'azione e interagiscono con diversi *pathway* intracellulari. L'espressione dell'mRNA di CXCL10 indotta dalle citochine è ridotta in modo significativo da elocalcitolo, mentre MMI e RGZ non determinano alcun effetto significativo. Probabilmente l'azione inibitoria sulla secrezione di CXCL10 di MMI e di RGZ è dovuta a una regolazione post-trascrizionale del messaggero. Per quanto riguarda l'up-regolazione di IFNR indotta dal  $TNF-\alpha$ , solo MMI ed elocalcitolo sono in grado di diminuirla, mentre RGZ non agisce a livello recettoriale. A livello dei *pathway* intracellulari elocalcitolo inibisce sia la via di  $IFN-\gamma$  sia quella di  $TNF-\alpha$ , inattivando STAT-1 e NF- $\kappa$ B, al contrario di MMI che interferisce solamente con l'attivazione di STAT-1 e di RGZ che agisce bloccando la fosforilazione e la traslocazione di NF- $\kappa$ B.

Come già ampiamente descritto, il loop auto-alimentante che s'instaura in GD prevede la produzione da parte delle cellule follicolari tiroidee, stimulate dalle citochine pro-infiammatorie, della chemochina CXCL10, che richiama nel sito d'infiammazione cellule infiltranti esprimenti il suo recettore specifico CXCR3, in particolare linfociti T CD4+. È stato quindi valutato l'effetto dei farmaci (MMI, RGZ ed elocalcitolo) sui linfociti umani T CD4+, isolati da PBMC ottenute da *buffy coats* di volontari sani e attivati con PMA e Ionomicina (P/I). In particolare è stata valutata l'azione di MMI, RGZ ed elocalcitolo sulla secrezione e sull'espressione genica di citochine di tipo Th1, Th17 e Th2 da parte di linfociti T CD4+.

Elocalcitolo e MMI inibiscono la secrezione delle citochine di tipo Th1 ( $IFN-\gamma$ ,

TNF- $\alpha$  e CXCL10), mentre RGZ determina una riduzione significativa soltanto di CXCL10. Inoltre, a differenza di MMI e di RGZ, elocalcitolo diminuisce la secrezione dell'IL-17, citochina secreta dai linfociti Th17 e aumenta le citochine di tipo Th2 (IL-4 e IL-5). I risultati dell'analisi dell'espressione dell'mRNA delle singole citochine conferma la modulazione determinata dai farmaci a livello proteico.

Durante la terapia anti-tiroidea, è stato dimostrato che MMI diminuisce il numero di linfociti Th nel sangue periferico e quello dei linfociti T attivati intratiroidi (Totterman *et al.* 1987). Inukai *et al.* (Inukai *et al.* 2007) hanno dimostrato che nei pazienti ipertiroidei affetti da GD, MMI sembra diminuire il numero di linfociti esprimenti CXCR3 e le concentrazioni plasmatiche del suo ligando CXCL10, mentre sembra aumentare la percentuale di cellule T esprimenti CCR4. Ciò suggerisce che il bilancio Th1/Th2, indicato dal rapporto CXCR3/CCR4, favorisce la progressiva transizione verso il fenotipo Th2 piuttosto di quello Th1 nelle fasi iniziali della malattia. Rimane dibattuto se MMI induca lo *shift* Th1 verso Th2 in modo diretto.

I risultati mostrano che nel modello *in vitro* di linfociti CD4+ umani attivati con P/I e in presenza di MMI la secrezione delle citochine di tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CXCL10) è ridotta, ma non si ha alcun effetto sulla secrezione di IL-17, citochina di tipo Th17 e neanche su quelle di tipo Th2, IL-4 e IL-5. Risulta quindi che MMI esercita un'azione di tipo anti-infiammatorio sui linfociti T, ma senza promuovere uno *shift* dal fenotipo Th1 verso quello Th2 a differenza di quanto dimostrato per elocalcitolo.

MMI sembra essere un inibitore selettivo delle risposte di tipo Th1 sia nelle cellule tiroidee, bloccando il *pathway* di IFN- $\gamma$ , sia nelle cellule T CD4+, inibendo la produzione di citochine Th1. È possibile quindi ipotizzare che lo *shift* dal fenotipo Th1 a quello Th2 osservato nei pazienti ipertiroidei affetti da GD e trattati con MMI (Inukai *et al.* 2007) sia dovuto ad una specifica soppressione della risposta di tipo Th1.

I TZD, agonisti di PPAR $\gamma$ , sono stati proposti come agenti terapeutici nel trattamento di patologie infiammatorie di tipo Th1, in quanto numerosi studi hanno dimostrato le loro proprietà anti-infiammatorie. PPAR $\gamma$  è presente nelle

cellule del sistema immunitario, regolandone il differenziamento e lo sviluppo e modulando l'espressione di citochine e di molecole costimolatorie (Zhang *et al.* 2002). Nelle DCs PPAR $\gamma$  è un regolatore negativo della maturazione e della funzione cellulare (Szatmari *et al.* 2006): i TZD, riducono la secrezione di IL-12 (citochina che promuove lo sviluppo dei linfociti Th1) e l'espressione di molecole costimolatorie quali CD80 e CD86, determinando quindi un aumento della risposta di tipo Th2. È riportato anche che l'attivazione di PPAR $\gamma$  da parte dei TZD influenza la funzione e la proliferazione dei linfociti T e riduce la produzione di TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 (Genolet *et al.* 2004). Recentemente è stato dimostrato che l'attivazione di PPAR $\gamma$  nelle cellule T CD4+ sopprime selettivamente il differenziamento dei Th17, ma non quello di Th1, Th2, o Treg (Klotz *et al.* 2009). Gli attivatori di PPAR $\gamma$  inibiscono l'espressione dei *markers* pro-infiammatori come TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  nei monociti e macrofagi, IL-2 nei linfociti T e CXCL10 e CCL5 in DC (Schaefer *et al.* 2005), chemochine coinvolte nel reclutamento dei linfociti Th1. In pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto è stato recentemente dimostrato che la somministrazione di RGZ determina l'inibizione dose-dipendente dell'espressione di IFN- $\gamma$  nelle cellule T CD4+ e CD8+ (Okosieme *et al.* 2006).

È necessario ricordare che in letteratura sono presenti anche lavori che dimostrano attività pro-infiammatorie dei TZD: RGZ ed altri TZD determinano l'aumento di IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e MCP-1 in monociti THP-1 (Hall *et al.* 2007) e in vari tipi di cellule epiteliali RGZ non riduce la risposta infiammatoria promossa da TNF- $\alpha$ , potenziando la produzione di GMC-SF, IL-6 e IL-8 indotta dalla citochina pro-infiammatoria (Desmet *et al.* 2005).

Nel modello *in vitro* di linfociti CD4+ umani attivati con P/I, RGZ 5 $\mu$ M determina la riduzione della quantità di CXCL10 secreto e riduce, ma senza raggiungere la significatività statistica, la secrezione delle citochine Th1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Il trattamento con RGZ non modula, invece, la produzione né di IL-17, né delle citochine di tipo Th2 (IL-4 e IL-5) da parte delle cellule T. Emerge quindi che RGZ presenta un'azione anti-infiammatoria sui linfociti T, in quanto down-regola la risposta Th1 e soprattutto non presenta un effetto pro-infiammatorio né diretto, come up-regolazione di citochine pro-infiammatorie, né indiretto tramite

down-regolazione di citochine Th2.

Gli agonisti di VDR sono in grado di inibire le cellule T pro-infiammatorie, come Th1 e Th17 e possono favorire lo sviluppo delle cellule con il fenotipo Th2 (Adorini *et al.* 2007a). Questi effetti possono, in parte essere spiegati come conseguenza di un targeting diretto delle cellule T, ma certamente anche la modulazione della funzione delle DC gioca un ruolo importante nella configurazione dello sviluppo della risposta delle cellule T. Gli agonisti di VDR possono agire sui linfociti in modo selettivo inibendo i subset che mediano il processo infiammatorio e promuovendo lo sviluppo di quelli Th2 (Adorini *et al.* 2007a). La somministrazione di elocalcitolo in cellule T di linfonodi prostatici di topi NOD affetti da prostatite autoimmune sperimentale diminuisce la produzione di IFN- $\gamma$  (Penna *et al.* 2006) e di IL-17, citochina pro-infiammatoria che svolge un ruolo patogenetico in molte malattie autoimmuni e probabilmente anche nel GD (Huber *et al.* 2008).

I risultati mostrano che elocalcitolo risulta un potente inibitore delle risposte infiammatorie sia nei tireociti sia nei linfociti T CD4+, dove inibisce la produzione di citochine di tipo Th1 e sposta la risposta verso il fenotipo Th2. In particolare, quest'ultimo dato risulta molto importante, in quanto lo *shift* immunologico verso il fenotipo Th2 è accompagnato nel GD da una progressiva diminuzione degli anticorpi contro il recettore del TSH (Inukai *et al.* 2007; McLachlan *et al.* 2005), che sono principalmente IgG1, sottoclasse di anticorpi Th1-indotta nell'uomo (McLachlan *et al.* 2005) e non IgE, sottoclasse Th2-indotta.

Per quanto riguarda il bilancio Th1/Th2, gli agonisti di VDR sono in grado di agire sia sulle cellule Th1 sia Th2 sulla base del loro stato di attivazione e di differenziazione ed è stata già suggerita la loro capacità di indirizzare le cellule T verso il fenotipo Th2, sebbene gli effetti sullo sviluppo delle cellule Th2 siano ancora dibattuti (Adorini *et al.* 2007a).

Inoltre la produzione di IL-17 da parte delle cellule T CD4+ opportunamente stimulate è ridotta in presenza di elocalcitolo. Questo risultato è molto interessante in termini del ruolo dei linfociti Th17 nelle patologie umane, anche se non è ancora noto se GD è una condizione dipendente dai Th17. Numerose malattie

infiammatorie e autoimmuni sono state associate all'espansione delle cellule Th17, guidata dalla citochina IL-23. Differenti polimorfismi del recettore per IL-23, che predispone allo sviluppo della malattia di Crohn, sono stati recentemente associati a GO (Huber *et al.* 2008). Recentemente, è stato dimostrato che la percentuale di cellule periferiche Th17 nei pazienti con AIDT è più alta rispetto ai soggetti di controllo e che è correlata con la non trattabilità di GD, in quanto il numero di cellule Th17 nei pazienti di GD non trattabile è maggiore di quella dei malati di GD in remissione (Nanba *et al.* 2009). Sicuramente, altri studi sono necessari per chiarire il ruolo delle cellule Th17 nella patogenesi di GD.

In conclusione, la ricerca svolta dimostra un nuovo effetto anti-infiammatorio di MMI, che risulta in grado di inibire la secrezione, mediata da IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , di CXCL10, chemochina prototipica coinvolta nell'autoimmunità ghiandolare, direttamente nelle cellule tiroidee, bloccando il meccanismo alla base della sinergia citochinica e nei linfociti T CD4+, inibendo anche la secrezione delle stesse citochine di tipo Th1. MMI agisce nei tireociti con la stessa potenza farmacologica di RGZ down-regolando la secrezione di CXCL10, ma attraverso differenti meccanismi d'azione. RGZ, come MMI, ha mostrato proprietà anti-infiammatorie anche nelle cellule T, inibendo le citochine di tipo Th1, ma senza promuovere l'aumento delle citochine Th2. Invece, elocalcitolo agisce nelle cellule tiroidee con una potenza farmacologica molto maggiore di MMI e RGZ, bloccando nelle cellule T la secrezione delle citochine pro-infiammatorie ed inibendo la loro azione sinergica nei tireociti, dove inducono la secrezione di CXCL10. Dato il ruolo importante delle chemochine indotte da IFN- $\gamma$  e in particolare di CXCL10, nella patogenesi e nel mantenimento delle malattie autoimmuni della tiroide Th1-mediate, i risultati ottenuti dallo studio condotto permettono di ipotizzare che una combinazione di differenti farmaci presentanti effetti inibitori simili su CXCL10, ma che hanno come target differenti *pathway* intracellulari, potrebbe essere un nuovo strumento farmacologico per il trattamento di GD e potrebbe permettere di diminuire i dosaggi terapeutici e di minimizzare gli effetti collaterali dei farmaci in uso.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abbas AK, Murphy K, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996 383:787–93.
- Adorini L, Amuchastegui S, Corsiero E, Laverny G, Le Meur T, Penna G. Vitamin D receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Expert Rev Clin Immunol*. 2007 3(4):477-489. (a)
- Adorini L, Amuchastegui S, Daniel KC. Prevention of chronic allograft rejection by vitamin D receptor agonists. *Immunol Lett*. 2005 100(1):34-41. (a)
- Adorini L, Gregori S, Harrison LC. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med*. 2002 8:31–38 (a)
- Adorini L, Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Fibbi B, Morelli A, Uskokovic M, Colli E, Maggi M. Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 103:689-693. (b)
- Adorini L: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 analogs as potential therapies in transplantation. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002 3(10):1458-1463. (b)
- Adorini L: Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell Immunol*. 2005 233(2):115-124. (b)
- Agace WW. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006 6:682-692.
- Agostini C, Calabrese F, Rea F, Facco M, Tosoni A, Loy M, Bigotto G, Valente M, Trentin L, Semenzato G. CXCR3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am J Pathol*. 2001 158:1703-1711.
- Ajjan RA, Grant PJ. The cardiovascular safety of Rosiglitazone. *Expert Opin Drug Saf*. 2008 7(4):367-376.
- Aniszewski JP, Valyasevi RW, Bahn RS. Relationship between disease duration and predominant orbital T cell subset in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 85:776-780.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Filì L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S: Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007 204:1849-1861.
- Antonelli A, Fallahi P, Rotondi M, Ferrari SM, Romagnani P, Grosso M, Ferrannini E, Serio M. Increased serum CXCL10 in Graves' disease or autoimmune thyroiditis is not associated with hyper- or hypothyroidism per se, but is specifically sustained by the autoimmune, inflammatory process. *Eur J Endocrinol*. 2006 154(5):651-8. (a)
- Antonelli A, Fallahi P, Rotondi M, Galleri D, Ferrari SM, Romagnani P, Serio M, Miccoli P. Increase of interferon- $\gamma$  inducible  $\alpha$  chemokine CXCL10 serum levels in patients with active Graves' disease, and modulation by methimazole therapy and thyroidectomy. *Br J Surg*. 2006 93:1226-1231. (b)
- Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P, Frascerra S, Santini E, Franceschini SS, Ferrannini E. Monokine induced by interferon gamma (IFN $\gamma$ ) (CXCL9) and IFN $\gamma$  inducible T-cell alpha-chemoattractant (CXCL11) involvement in Graves' disease and ophthalmopathy:

- modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 94(5):1803-9.
- Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Grosso M, Boni G, Ferrari SM, Romagnani P, Serio M, Mariani G, Ferrannini E. Iodine-131 given for therapeutic purposes modulates differently interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 serum levels in patients with active Graves' disease or toxic nodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 92(4):1485-90.
  - Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Barani L, Ferrannini E, Serio M. Increase of interferon-gamma-inducible CXC chemokine CXCL10 serum levels in patients with active Graves' disease, and modulation by methimazole therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006 64(2):189-95. (c)
  - Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Buonamano A, Ferrannini E, Serio M. High levels of circulating CXC chemokine ligand 10 are associated with chronic autoimmune thyroiditis and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 89(11):5496-9.
  - Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Paolicchi A, Ferrannini E, Serio M. Increase of interferon- $\gamma$  inducible  $\alpha$  chemokine CXCL10 but not beta chemokine CCL2 serum levels in chronic autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol.* 2005 152(2):171-7.
  - Antonelli A, Rotondi M, Ferrari SM, Fallahi P, Romagnani P, Franceschini SS, Serio M, Ferrannini E. Interferon- $\gamma$ -inducible  $\alpha$ -chemokine CXCL10 involvement in Graves' ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 91(2):614-20. (d)
  - Armengol MP, Cardoso-Schmidt CB, Fernández M, Ferrer X, Pujol-Borrell R, Juan M. Chemokines determine local lymphoneogenesis and a reduction of circulating CXCR4+ T and CCR7 B and T lymphocytes in thyroid autoimmune diseases. *J Immunol.* 2003 170(12):6320-8.
  - Aschenbrenner JK, Sollinger HW, Becker BN, Hullett DA. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Alters the Transforming Growth Factor  $\beta$  signaling pathway in renal tissue. *Journal of Surgical Research.* 2000 100(2):171-175
  - Ashcroft DM, Po AL, Williams HC, Griffiths CE. Systematic review of comparative efficacy and tolerability of calcipotriol in treating chronic plaque psoriasis. *Br. Med. J.* 2000 320(7240):963-967.
  - Aso Y, Matsuura H, Momobayashi A, Inukai Y, Sugawara N, Nakano T, Yamamoto R, Wakabayashi S, Takebayashi K, Inukai T. Profound reduction in T-helper (Th) 1 lymphocytes in peripheral blood from patients with concurrent type 1 diabetes and Graves' disease. *Endocr J.* 2006 53(3):377-85.
  - Azizi F. The safety and efficacy of antithyroid drugs *Expert Opin. Drug Saf.* 2006 5(1):107-116.
  - Bach EA, Aguet M, Sreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997 15:563-91.
  - Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappaB: Ten years after. *Cell.* 1996 87(1):13-20.
  - Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines, CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 1994 55:97-179.
  - Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 22:717-26.
  - Barman Balfour JA, Plosker GL. Rosiglitazone. *Drugs.* 1999 57:921-30.
  - Barna M, Bos JD, Kapsenberg ML, Snijdwint FG. Effect of calcitriol on the production of T-cell-derived cytokines in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 1997 136(4):536-541.

- Bartalena L, Tanda ML, Bogazzi F, Piantanida E, Lai A, Martino E. An update on the pharmacological management of hyperthyroidism due to Graves' disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2005 6(6):851-61.
- Baud V., Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology.* 2001 11(9):372-377.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1999 385:640-644.
- Becker BN, Hullett DA, O'herrin JK, Malin G, Sollinger HW, Deluca H: Vitamin D as immunomodulatory therapy for kidney transplantation. *Transplantation.* 2002 74(8):1204-1206.
- Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPAR $\gamma$ . *J Clin Invest.* 2003 112:945-55.
- Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002 53:409-35.
- Bhalla AK, Amento EP, Serog B, Glimcher LH. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen induced T cell activation. *J Immunol.* 1984 133:1748-54.
- Bikfalvi A. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin Thromb Hemost.* 2004 30:379-385.
- Blank M, Barzilai O, Shoenfeld Y. Molecular mimicry and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007 32(1):111-8.
- Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem.* 2001 276:9945-9954.
- Bonocchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* 1998 187:129-134.
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4+ T cells to enhance the development of Th2 Cells. *J Immunol.* 2001 167:4974-80.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2 $^{-/-}$  mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998 394:894-7.
- Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, Dagenais G, Diaz R, Avezum A, Lanus F, Probstfield J, Fodor G, Holman RR. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med* 2006 355:1551-62.
- Bouillon R, Verlinden L, Eelen G, De Clercq P, Vandewalle M, Mathieu C, Verstuyf A. Mechanisms for the selective action of Vitamin D analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 97(1-2):21-30.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976 72:248-54.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease *J Pathol.* 2008; 214:149-160.
- Cameron MJ, Arreaza GA, Grattan M, Meagher C, Sharif S, Burdick MD, Strieter RM, Cook DN, Delovitch TL. Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J Immunol.* 2000 165:1102-10.

- Campbell JD, Gangur V, Simons FE, HayGlass KT. Allergic humans are hyporesponsive to a CXCR3-ligand-mediated Th1 immunity- promoting loop. *FASEB J.* 2004 18:329-331.
- Campbell MJ, Adorini L. The vitamin D receptor as atherapeutic target *Expert Opin Ther Targets* 2006 10(5):735-748.
- Cantini G, Lombardi A, Piscitelli E, Poli G, Ceni E, Marchiani S, Ercolino T, Galli A, Serio M, Mannelli M, Luconi M. Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF-IR intracellular signaling. *PPAR Res.* 2008 2008:904041.
- Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr.* 2000 130:2648-2652.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006 354:610-21.
- Chen W, Lin H, Wang M. Immune intervention effects on the induction of experimental autoimmune thyroiditis *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2002 22(4):343-354.
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998 273(40):25573-80.
- Christopherson KII, Hromas R. Chemokine Regulation of Normal and Pathologic Immune Responses. *STEM CELLS.* 2001 19:388-396.
- Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR $\gamma$  and immunoregulation: PPAR $\gamma$  mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol.* 2000 164( 3):1364-1371.
- Codaccioni JL, Orgiazzi J, Blanc P, Pugeat M, Roulier R & Carayon P. Lasting remissions in patients treated for Graves' hyperthyroidism with propranolol alone: a pattern of spontaneous evolution of the disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1988 67:656–662.
- Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med.* 1998 187:2009-2021.
- Colli E, Rigatti P, Montorsi F, Artibani W, Petta S, Mondaini N, Scarpa R, Usai P, Olivieri L, Maggi M; the BPH Italian study group. BXL628, a novel vitamin D3 analog arrests prostate growth in patients with benign prostatic hyperplasia: a randomized clinical trial. *Eur Urol.* 2006 49:82-6.
- Cooper DS. Antithyroid Drugs. *N Engl J Med.* 2005 352:905-17.
- Cooper DS. Hyperthyroidism. *Lancet.* 2003 362(9382):459-68.
- Corrales JJ, López A, Ciudad J, Mories MT, Miralles JM, Orfao A. Methimazole therapy in Graves' disease influences the abnormal expression of CD69 (early activation antigen) on T cells. *J Endocrinol.* 1997 155(3):491-500.
- Cox PJ, Ryan DA, Hollis FJ, Harris AM, Miller AK, Vousden M, Cowley H. Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2000 28:772-80.
- Crescioli C, Ferruzzi P, Caporali A, Scaltriti M, Bettuzzi S, Mancina R, Gelmini S, Serio M, Villari D, Vannelli GB, Colli E, Adorini L, Maggi M. Inhibition of prostate cell growth by BXL-628, a calcitriol analogue selected for a Phase II clinical trial in patients with benign prostate hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2004 150(4):591-603.

- Crescioli C, Morelli A, Adorini L, Ferruzzi P, Luconi M, Vannelli GB, Marini M, Gelmini S, Fibbi B, Donati S, Villari D, Forti G, Colli E, Andersson KE, Maggi M. Human bladder as a novel target for vitamin D receptor ligands. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 90(2):962-972.
- Crescioli C, Squecco R, Cosmi L, Sottili M, Gelmini S, Borgogni E, Sarchielli E, Scolletta S, Francini F, Annunziato F, Vannelli GB, Serio M. Immunosuppression in cardiac graft rejection: a human in vitro model to study the potential use of new immunomodulatory drugs. *Exp Cell Res.* 2008 314(6):1337-50.
- Cutolo M, Otsa K, Uprus M, Paolino S, Serio B. Vitamin D in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2007 7:59-64.
- D'Ambrosio D, Cippitelli M, Coccio MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P. Inhibition of IL 12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest.* 1998 101:252-62.
- Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 324:23-33.
- Davidson B, Soodak M, Neary JT, Strout HV, Kieffer JD, Mover H, Maloof F. The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil, and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings. *Endocrinology.* 1978 103(3):871-82.
- Davis SJ, Ikemizu S, Evans EJ, Fugger L, Bakker TR, van der Merwe PA. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol.* 2003 4:217-224.
- Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002 2:748-59.
- De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *American Journal of Physiology.* 1978 235:E97-E102.
- Desmet C, Warzée B, Gosset P, Mélotte D, Rongvaux A, Gillet L, Fiévez L, Seumois G, Vanderplasschen A, Staels B, Lekeuxa P, Bureau F. Pro-inflammatory properties for thiazolidinediones. *Biochemical Pharmacology* 2005 69:255-265.
- Diab A, Deng C, Smith JD, Hussain RZ, Phanavanh B, Lovett-Racke AE, Drew PD, Racke MK. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist 15-deoxy-D12,14-PGJ<sub>2</sub> ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002 168:2508-15.
- Diamond GA, Bax L, Kaul S. Uncertain effects of rosiglitazone on the risk for myocardial infarction and cardiovascular death. *Ann Intern Med.* 2007 147:578-81.
- Díez JJ, Hernanz A, Medina S, Bayón C, Iglesias P. Serum concentrations of tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and soluble TNF- $\alpha$  receptor p55 in patients with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after normalization of thyroid function. *Clinical Endocrinology.* 2002 57:515-521.
- Douni E, Akassoglou K, Alexopoulou L, Georgopoulos S, Haralambous S, Hill S, Kassiotis G, Kontoyiannis D, Pasparakis M, Plows D, Probert L, Kollias G. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm.* 1995 47(1-2):27-38.
- Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10/CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 2002 168:3195-3204.
- Eksteen B, Liaskou E, Adams DH. Lymphocyte homing and its role in the pathogenesis of IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 14(9):1298-312.

- El-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol*. 2002 14:562-568.
- Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 87:5238-5242.
- Feldmann M, Maini RN, Bondeson J, Taylor P, Foxwell BM, Brennan FM. Cytokine blockade in rheumatoid arthritis. *Adv Exp Med Biol*. 2001 490:119-27.
- Feng L. Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. *Immunol Res*. 2000 21:203-210.
- Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J. (1990) In vivo beneficial effect of cyclosporine A and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 1990 54:53-63
- Frigerio S, Junt T, Lu B, Gerard C, Zumsteg U, Holländer GA, Piali L. Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nat Med*. 2002 8(12):1414-20.
- Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by human dendritic cells. *Blood*. 2003 102:3314-3316.
- Fukuya Y, Higaki M, Higaki Y, Kawashima M. Effect of vitamin D<sub>3</sub> on the increased expression of Bcl-xL in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2002 293(12):620-625.
- García-López MA, Sancho D, Sánchez-Madrid F, Marazuela M. Thyrocytes from autoimmune thyroid disorders produce the chemokines IP-10 and Mig and attract CXCR3+ lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 86:5008-5016.
- Genolet R, Wahli W, Michalik L. PPARs as drug targets to modulate inflammatory responses? *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004 3(4):361-75.
- Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001 2:108-15.
- Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, van Eden W, van der Zee R, Biedermann T, Prinz J, Mack M, Mrowietz U, Christophers E, Schlöndorff D, Plewig G, Sander CA, Röcken M. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med*. 2003 9:40-6.
- Giannini S, Serio M, Galli A. Pleiotropic effects of thiazolidinediones: taking a look beyond antidiabetic activity. *J Endocrinol Invest*. 2004 27(10):982-91.
- Giarratana N, Penna G, Amuchastegui S, Mariani R, Daniel KC, Adorini L. A vitamin D analog down-regulates pro-inflammatory chemokine production by pancreatic islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development. *J Immunol*. 2004 173:2280-2287.
- Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, Tonnel AB, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001 31:2857-2865.
- Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J*. 1994 13:1591-600.
- Gregori G, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analog enhances regulatory T cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002 51:1376-1374.
- Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol*. 2001 167:1945-53.

- 
- Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 98(12):6800-5.
  - Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2002 106(6):679-84.
  - Hall JM, McDonnell DP. The Molecular Mechanisms Underlying the Pro-inflammatory Actions of Thiazolidinediones in Human Macrophages *Molecular Endocrinology* 2007 21(8):1756-1768.
  - Hancock WW, Gao W, Csizmadia V, Faia K, Shemmeri N, Luster AD. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection. *J Exp Med*. 2001 193:975-980.
  - Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia K, King JA, Smiley ST, Ling M, Gerard NP, Gerard C. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med*. 2000 192:1515-1520.
  - Hebert CA, Vitangcol RV, Baker JB. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J Biol Chem*. 1991 266:18989-18994.
  - Hill N, Sarvetnick N. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity *Curr Opin Immunol*. 2002 14(6):791-7.
  - Holter W, Grunow R, Stockinger H, Knapp W. Recombinant interferon- $\alpha$  induces interleukin-2 receptors on human peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 1986 136:2171-2178.
  - Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J exp Med*. 2001 193(6):713-726.
  - Huber AK, Jacobson EM, Jazdzewski K, Concepcion ES, Tomer Y. Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 93(3):1077-81.
  - Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opinion in Cell Biology*. 2001 13:211-217.
  - Inukai Y, Momobayashi A, Sugawara N, Aso Y. Changes in expression of T-helper (Th) 1- and Th2-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes and plasma concentrations of their ligands, interferon-inducible protein-10 and thymus and activation-regulated chemokine, after antithyroid drug administration in hyperthyroid patients with Graves' disease. *European J Endocrinol*. 2007 156:623-630.
  - Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 5:987-95.
  - Jansson R, Dahlberg PA, Lindstrom B. Comparative bioavailability of carbimazole and methimazole. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1983 21:505-10.
  - Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998 391:82-6.
  - Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*. 2001 6, 34-55.
  - Kang HC, Ohmori M, Harii N, Endo T, Onaya T. Pax8 is essential for regulation of the thyroglobulin gene by transforming growth factor-beta1. *Endocrinology*. 2001 142:267-275.
  - Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000 18:621-63.

- Karpus WJ, Lujacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol.* 1997 158:4129-36.
- Kasai K, Banba N, Hishinuma A, Matsumura M, Kakishita H, Matsumura M, Motohashi S, Sato N, Hattori Y. 15-Deoxy-12,14-prostaglandin J2 facilitates thyroglobulin production by cultured human thyrocytes. *Am J Physiol.* 2000 279:1859-1869.
- Kasai K, Banba N, Motohashi S, Hattori Y, Manaka K, Shimoda S. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA and protein in cultured human thyrocytes. *FEBS Lett.* 1996 394:137-140.
- Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest.* 2000 106:189-97.
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 1994 266(5189):1395-9.
- Kemp EH, Metcalfe RA, Smith KA, Woodroffe MN, Watson PF, Weetman AP. Detection and localization of chemokine gene expression in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol.* 2003 59:207-213.
- Kimura H, Caturegli P. Chemokine orchestration of autoimmune thyroiditis. *Thyroid.* 2007 17(10): 1005-11.
- Klotz L, Schmidt S, Heun R, Klockgether T, Kölsch H. Association of the PPARgamma gene polymorphism Pro12Ala with delayed onset of multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2009 2;449(1):81-3.
- Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005 51(2):85-94.
- Krakauer T, Oppenheim JJ. IL-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  each up-regulate both the expression of IFN- $\gamma$  receptors and enhance IFN- $\gamma$ -induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol.* 1993 150:1205-1211.
- Kunkel SL, Godessart N. Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmunity Reviews.* 2002 1:313-320.
- Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N.Y. Acad Sci.* 2009 1173:310-317.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 227:680-5.
- Lafaille JJ. The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998 9(2):139-51.
- 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 201:233-40.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol.* 2001 2:487-492.
- Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, Sagrinati C, Mazzinghi B, Orlando C, Maggi E, Marra F, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med.* 2003 197:1537-1549.
- Lauberg P. Remission of Graves' disease during anti-thyroid drug therapy. Time to reconsider the mechanism? *European Journal of Endocrinology.* 2006 155:783-786.

- Lazzeri E, Romagnani P. CXCR3-binding chemokines: novel multifunctional therapeutic targets. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2005 5:109-118. (a)
- Lazzeri E, Rotondi M, Mazzinghi B, Lasagni L, Buonamano A, Rosati A, Pradella F, Fossombroni V, La Villa G, Gacci M, Bertoni E, Serio M, Salvadori M, Romagnani P. High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2005 79(9):1215-20. (b)
- Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4- producing cells. *J Exp Med*. 1990 172:921-29.
- LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 291(1):E175-81.
- Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25 dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr*. 1995 125:1704S-8S.
- Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000 106:523-31.
- Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 2:725-734.
- Lillemeier BF, Köster M, Kerr IM. STAT1 from the cell membrane to the DNA. *EMBO J*. 2001 20(10):2508-17.
- Littorin, B, Blom P, Schölin A, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Ekblom-Schnell A, Eriksson JW, Gudbjörnsdóttir S, Nyström L, Ostman J, Sundkvist G. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia*. 2006 49:2847-2852.
- Liu C, Papewalis C, Domberg J, Scherbaum W A, Schott M. Chemokines and autoimmune thyroid diseases. *Horm Metab Res*. 2008 40:361-368.
- Liu Z. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Research*. 2005 15(1):24-27.
- Livak K, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 2001 25:402-408.
- Lombardi A, Cantini G, Mello T, Francalanci M, Gelmini S, Cosmi L, Santarlasci V, Degl'Innocenti S, Luciani P, Deledda C, Annunziato F, Forti G, Galli A, Serio M, Luconi M. Molecular mechanisms underlying the pro-inflammatory synergistic effect of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  in human microvascular endothelium. *Eur J Cell Biol*. 2009 *Eur J Cell Biol*. 2009 88(12):731-42.
- Lombardi A, Cantini G, Piscitelli E, Gelmini S, Francalanci M, Mello T, Ceni E, Varano G, Forti G, Rotondi M, Galli A, Serio M, Luconi M. A new mechanism involving ERK contributes to rosiglitazone inhibition of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inflammatory effects in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vas.c Biol* 2008 28:718-24.
- Luconi M, Cantini G, Serio M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? *Steroids*. In Press
- Luster AD, Unkles JC, Ravetch JV. Gamma-Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*. 1985 315:672-676.

- Maalej A, Petit-Teixeira E, Chabchoub G, Hamad MB, Rebai A, Farid NR, Cornelis F, Ayadi H. Lack of association of VDR gene polymorphisms with thyroid autoimmune disorders: familial and case/control studies. *J Clin Immunol.* 2008 28(1):21-5.
- Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Ruggiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S Reciprocal regulatory role of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 cells. *J Immunol.* 1992 148:2142-7.
- Maggi, M, Crescioli C, Morelli A, Colli E, Adorini L. Preclinical evidence and clinical translation of benign prostatic hyperplasia treatment by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (Elocalcitol). *J Endocrinol Invest.* 2006 29:665-674.
- Makay IR, Rosen FS. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med.* 2001 344(9):655-664.
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) induces T helper type 1 (Th1)- specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993 177:1199-204.
- Marazuela M, Postigo AA, Acevedo A, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F, de Landazuri MO. Adhesion molecules from the LFA-1/ICAM-1,3 and VLA-4/VCAM-1 pathways on T lymphocytes and vascular endothelium in Graves' and Hashimoto's thyroid glands. *Eur J Immunol.* 1994 24:2483-2490.
- Marchant B, Alexander WD, Lazarus JH, Lees J, Clark DH. The accumulation of 35 S-antithyroid drugs by the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 1972 34(5):847-51.
- Margolick JB, Weetman AP, Burman KD. Immunohistochemical analysis of intrathyroidal lymphocytes in Graves' disease: evidence of activated T cells and production of interferon-gamma. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988 47(2):208-18.
- Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med.* 2001 7(8):899-905.
- Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: Implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res.* 2002 90:703-10.
- Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol.* 2000 164:6503-8.
- Mathieu C, van Etten E, Gysemans C, Decallonne B, Kato S, Laureys J, Depovere J, Valckx D, Verstuyf A, Bouillon R. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor-knock out mice. *J Bone Miner Res.* 2001 16:2057-65.
- Matsuzaki J, Tsuji T, Zhang Y, Wakita D, Imazeki I, Sakai T, Ikeda H, Nishimura T. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 downmodulates the functional differentiation of Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells beneficial for cytotoxic T lymphocyte generation. *Cancer Sci.* 2006 97:139-147.
- McGregor AM, Petersen MM, McLachlan SM, Rooke P, Smith BR, Hall R. Carbimazole and the autoimmune response in Graves' disease. *New England Journal of Medicine* 1980 7 302-307.
- McLachlan SM, Nagayama Y, Rapoport B. Insight into Graves' hyperthyroidism from animal models. *Endocrine Reviews.* 2005 26 800-832.
- Melter M, Exeni A, Reinders ME, Fang JC, McMahon G, Ganz P, Hancock WW, Briscoe DM. Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection. *Circulation.* 2001 104:2558-2564.

- Mimura LY, Villares SM, Monteiro ML, Guazzelli IC, Bloise W. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene expression in orbital adipose/connective tissues is increased during the active stage of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2003 13:845-848.
- Miyazaki A, Hanafusa T, Itoh N, Miyagawa J, Kono N, Tarui S, Kiyotaki C, Yoshizaki K. Demonstration of IL-1 $\beta$  on perifollicular endothelial cells in the thyroid glands of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989 69(4):738-44.
- Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews Immunology.* 2008 8:685-698.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004 25:75-84.
- Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Adv Immunol* 1989 46:111-47.
- Muller K, Kriegbaum NJ, Baslund B, Sørensen OH, Thymann M, Bentzen K. Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 1995 14:397-400.
- Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003 24:327-34.
- Murreille E, Leo O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol.* 1998 47:1-9.
- Nagayama Y, Mizuguchi H, Hayakawa T, Niwa M, McLachlan SM, Rapoport B. Prevention of autoantibody-mediated Graves'-like hyperthyroidism in mice with IL-4, a Th2 cytokine. *Journal of Immunology.* 2003 170:3522-3527.
- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005 26(5):662-87.
- Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid.* 2009 19(5):495-501.
- Nicoletti F, Conget I, Di Mauro M, Di Marco R, Mazzarino MC, Bendtzen K, Messina A, Gomis R. Serum concentrations of the interferon-gamma-inducible chemokine IP-10/CXCL10 are augmented in both newly diagnosed Type I diabetes mellitus patients and subjects at risk of developing the disease. *Diabetologia.* 2002 45(8):1107-10.
- Niino M, Iwabuchi K, Kikuchi S, Ato M, Morohashi T, Ogata A, Tashiro K, Onoe K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-g. *J Neuroimmunol.* 2001 116:40-8.
- Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2007 356:2457-2471.
- Norman AW, Ishizuka S, Okamura WH. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 76:49– 59.
- Norman MU, Hickey MJ. Mechanisms of lymphocyte migration in autoimmune disease. *Tissue Antigens.* 2005 66(3):163-72.
- O'shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology.* 2002 2(1):37-45.
- Okamura Y, Shigemasa C, Tatsuhara T. Pharmacokinetics of methimazole in normal subjects and hyperthyroid patients. *Endocrinol Jpn.* 1986 33:605-15.

- Okosieme OE, Parkes AB, Premawardhana LD, Thomas AW, Evans LM, Lazarus JH. Peripheral cytokine expression in autoimmune thyroiditis: effects of in vitro modulation by rosiglitazone and dexamethasone. *Thyroid*. 2006 Oct;16(10):953-60.
- Orbach H, Zandman-Goddard G, Amital H, Barak V, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepány T, Carvalho JF., Doria A, Shoenfeld Y. Novel Biomarkers in Autoimmune Diseases. Prolactin, Ferritin, Vitamin D, and TPA Levels in Autoimmune Diseases. *Ann NY Acad Sci*. 2007 1109:385-400.
- Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, Goltzman D. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 98:7498-503.
- Papageorgiou E, Pitulis N, Manoussakis M, Lembessis P, Koutsilieris M. Rosiglitazone attenuates insulin-like growth factor 1 receptor survival signaling in PC-3 cells. *Mol Med*. 2008 14:403-11.
- Parronchi P, Sampognaro S, Annunziato F, Brugnolo F, Radbruch A, Di Modugno F, Ruffilli A, Romagnani S, Maggi E. Influence of both TCR repertoire and severity of the atopic status on the cytokine secretion profile of *Parietaria officinalis*-specific T cells *Eur J Immunol*. 1998 28(1):37-46
- Pease JE, Williams TJ. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *British Journal of Pharmacology*. 2006 147:S212-S221.
- Penna G, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*. 2000 164:2405-11.
- Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C, Adorini L. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol*. 2006 177:8504-8511.
- 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 178:145-153.
- Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, Adorini L. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood*. 2005 106:3490-3497.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004 202:8-32.
- Pinchera A, Liberti P, Martino E, Fenzi GF, Grasso L, Rovis L, Baschieri L & Doria G. Effects of antithyroid therapy on the long-acting thyroid stimulator and the antithyroglobulin antibodies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1969 29:231-238.
- Pinette V, Yee YK, Amegadzie BY, Nagpal S. Vitamin D receptor as a drug discovery target. *Mini Rev Med Chem* 2003 3:193-204.
- Plataniias LC, Fish E, N. Signaling pathways activated by interferons. *Experimental Hematology*. 1999 27:1583-1592.
- Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res*. 2002 4(3Suppl):S109-16.
- Powell JD. The induction and maintenance of T cell anergy. *Clin Immunol* 2006 120:239-46.
- Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev*. 2003 24(6):802-35.
- Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature Rev. Immunol*. 2002 2:106-15.

- Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science* 1983 221:1181-3.
- Räsänen-Sokolowski AK, Pakkala IS, Samila SP, Binderup L, Häyry PJ, Pakkala ST. A vitamin D analog, MC1288, inhibits adventitial inflammation and suppresses intimal lesions in rat aortic allografts. *Transplantation*. 1997 63:936-941.
- Ramos-Lopez E, Kurylowicz A, Bednarczuk T, Paunkovic J, Seidl C, Badenhop K. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. *Thyroid*. 2005 15(10):1125-30.
- Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest*. 2001 108(9):1253-9.
- Richy F, Ethgen O, Bruyere O, Reginster JY. Efficacy of alphacalcidol and calcitriol in primary and corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis of their effects on bone mineral density and fracture rate. *Osteoporos Int*. 2004 15(4):301-10.
- Rigby WF, Denome S, Fanger MW. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Specific inhibition at the level of messenger RNA. *J Clin Invest* 1987 79:1659-64.
- Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F, Lasagni L, Luconi M, Galli G, Cosmi L, Maggi E, Salvadori M, Pupilli C, Serio M. Role for interactions between IP-10/Mig and their receptor (CXCR3) in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1999 10:2518-2526.
- Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol*. 2004 25:201-209.
- Romagnani P, Lazzeri E, Lasagni L, Mavilia C, Beltrame C, Francalanci M, Rotondi M, Annunziato F, Maurenzig L, Cosmi L, Galli G, Salvadori M, Maggi E, Serio M. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. *J Am Soc Nephrol*. 2002 13(1):53-64. (a)
- Romagnani P, Maggi L, Mazzinghi B, Cosmi L, Lasagni L, Lotta F, Lazzeri E, Angeli R, Rotondi M, Fili L, Parronchi P, Serio M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on Th1 or Th2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 116:1372-1379.
- Romagnani P, Rotondi M, Lazzeri E, Lasagni L, Francalanci M, Buonamano A, Milani S, Vitti P, Chiovato L, Tonacchera M, Bellastella A, Serio M. Expression of IP-10/CXCL10 and Mig/CXCL9 in the thyroid and increased serum levels of IP-10/CXCL10 in the serum of subjects with recent onset Graves' disease. *Am J Pathol*. 2002 161:195-206. (b)
- Romagnani S, Emmi L, Almerigogna F. *Malattie del sistema immunitario* Ed. McGraw-Hill 2° edizione 2000.
- Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular Immunology*. 2009 47(1):3-7.
- Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today*. 1991 12:256-7.
- Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clinical Experim Allergy*. 2006 36:1357-1366.
- Romagnani S. T helper subsets in human disease states. *Annu Rev Immunol*. 1994 12:227-257.
- Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004 22:891-928.
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF- $\kappa$ B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*. 1995 269:1424-1427.
- Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev*. 2007 28:492-520.

- Rotondi M, Falorni A, De Bellis A, Laureti S, Ferruzzi P, Romagnani P, Buonamano A, Lazzeri E, Crescioli C, Mannelli M, Santeusano F, Bellastella A, Serio M. Elevated serum interferon-gamma-inducible chemokine-10/CXC chemokine ligand-10 in autoimmune primary adrenal insufficiency and in vitro expression in human adrenal cells primary cultures after stimulation with pro-inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 90(4):2357-63.
- Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, Serio M. Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field. *J Endocrinol Invest* 2003 26:177-80.
- Ruggiero V., Tavernier J., Fiers W., Baglioni C. Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma, *J. Immunol.* 1986 136:2445-2450.
- Rutenfranz I, Kruse A, Rink L, Wenzel B, Arnholdt H, Kirchner H In situ hybridization of the mRNA for IFN-gamma, IFN-alpha e, IFN-beta, IL-1 beta and IL-6 and characterization of infiltrating cells in thyroid tissues. *J Immunol Methods.* 1992 148(1-2):233-42.
- Salomon I, Netzer N, Wildbaum G, Schif-Zuck S, Maor G, Karin N. Targeting the function of IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 suppresses ongoing adjuvant arthritis. *J Immunol.* 2002 169:2685-2693.
- Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri M, Giuliani N, Minelli R, Braverman LE, Roti E. Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 81(8):2976-9.
- Sanceau J, Merlin G, Wietzerbin J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and IL-6 up-regulate IFN- $\gamma$  receptor gene expression in human monocytic THP-1 cells by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal Of Immunology.* 1992 149(5):1671-1675.
- Santini E, Fallahi P, Ferrari SM, Masoni A, Antonelli A, Ferrannini E. Effect of PPAR-activation and inhibition on glucose-stimulated insulin release in INS-1e cells. *Diabetes.* 2004 53:S79-S83.
- Sauty A., Dziejman M., Taha R.A., Iarossi A.S., Neote K., Garcia-Zepeda E.A., Hamid Q., Luster A.D. The T Cell-Specific CXC Chemokines IP-10, Mig, and I-TAC Are Expressed by Activated Human Bronchial Epithelial Cells. *The Journal of Immunology,* 1999 162:3549-3558.
- Schaefer KL, Denevich S, Ma C, Cooley SR, Nakajima A, Wada K, Schlezinger J, Sherr D, Saubermann LJ. Intestinal anti-inflammatory effects of thiazolidenedione peroxisome proliferator-activated receptor-ligands on T helper type 1 chemokine regulation include nontranscriptional control mechanisms. *Inflamm Bowel Dis.* 2005 11:244-252.
- Schindler H, Lutz MB, Rollinghoff M, Bogdan C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol.* 2001 166:3075-3082.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 75(2):163-89.
- Segerer S, Cui Y, Eitner F, Goodpaster T, Hudkins KL, Mack M, Cartron JP, Colin Y, Schlondorff D, Alpers CE. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis.* 2001 37:518-531.
- Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S. Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2001 24(3):510-5.
- Shirey KA, Jung JY, Maeder GS, Carlin JM. Upregulation of IFN- $\gamma$  receptor expression by pro-inflammatory cytokines influencesIDO activation in epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2006 26(1):53-62

- Simmonds MJ, Gough SCL. Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. *British Medical Bulletin*. 2005 71:93-113.
- Slatopolsky E, Brown AJ. Vitamin D analogs for the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Blood Purif*. 2002 20(1):109-12.
- Slowik MR, De Luca LG, Fiers W, Pober JS. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol*. 1993 143(6):1724-30.
- Sonnet E, Massart C, Gibassier J, Allannic H, Maugendre D. Longitudinal study of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera of patients with Graves' disease. *J Endocrinol Invest*. 1999 22(6):430-5.
- Sottili M, Cosmi L, Borgogni E, Sarchielli E, Maggi L, Francalanci M, Vannelli GB, Ronconi E, Adorini L, Annunziato F, Romagnani P, Serio M, Crescioli C. Immunomodulatory effects of BXL-01-0029, a less hypercalcemic vitamin D analogue, in human cardiomyocytes and T cells. *Exp Cell Res*. 2009 315(2):264-73.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 76:301-14.
- Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005 54(8):2460-70.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Sreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998 67:227-64.
- Starkey K, Heufelder A, Baker G, Joba W, Evans M, Davies S, Ludgate M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in thyroid eye disease: contraindication for thiazolidinedione use? *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 88(1):55-9.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003 21:139-76.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Rocznik S, Shanafelt AB. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995 270:27348-27357.
- Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- $\gamma$  ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*. 1999 104:383-389.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003 21:713-58.
- Sztatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 1088:207-18.
- Szekanecz Z, Szücs G, Szántó S, Koch AE. Chemokines in rheumatic diseases. *Curr Drug Targets*. 2006 7(1):91-102.
- Tanghetti EA. The role of topical vitamin D modulators in psoriasis therapy. *J Drugs Dermatol*. 2009 8(8 Suppl):s4-8.
- Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics: an update. *European Journal of Pharmacology*. 2008 579:1-12.
- Totterman TH, Karlsson FA, Bengtsson M & Mendel-Hartvig I. Induction of circulating activated suppressor-like T cells by methimazole therapy for Graves' disease. *New England Journal of Medicine*. 1987 316:15-22.

- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol.* 1993 9:317-343.
- Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 27(1):48-55.
- Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS. Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 87(5):2352-8.
- van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2005 97:93-101.
- Varga T, Nagy L. Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Eur J Clin Invest.* 2008 38(10):695-707.
- Vidal M, Ramana CV, Dusso AS. Stat1-vitamin D receptor interactions antagonize 1,25-dihydroxyvitamin D transcriptional activity and enhance stat1-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 2002 22:2777-2787.
- Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008 48:171-97.
- Volpé R. Evidence that the immunosuppressive effects of antithyroid drugs are mediated through actions on the thyroid cell, modulating thymocyte- immunocyte signaling: a review. *Thyroid* 1994 4(2):217-23.
- Volpé R. The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signalling: a review. *Curr Pharm Des.* 2001 7(6):451-60.
- Volpé R. The pathophysiology of autoimmune thyroid disease. *Endocr Regul.* 1991 25(4):187-92.
- Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Aderka D, Kemper O, Hornik V, Holtmann H, Brakebusch C. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl.* 1991 35:51-57.
- Watson PF, Pickerill AP, Davies RW, Weetman AP. Semiquantitative analysis of IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-8 mRNA expression by human thyrocytes. *Journal of molecular endocrinology.* 1995 15:11-21.
- Weetman AP, Ajjan RA, Watson PF. Cytokines and Graves' disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997 11(3):481-97.
- Weetman AP, Bennett GL, Wong WLT. Thyroid follicular cells produce interleukin-8. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 75:328-330.
- Weetman AP. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol.* 2003 148(1):1-9.
- Weetman AP. Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 61(4):405-13.
- Weetman AP. Graves' disease. *New England Journal of Medicine.* 2000 343:1236-1248.
- Weetman AP. The genetics of autoimmune thyroid disease. *Horm Metab Res.* 2009 41(6):421-5.
- Weetman AP. The immunomodulatory effects of antithyroid drugs (editorial). *Thyroid* 1994 4:145-6.

- Wenzel KW, Lente JR. Similar effects of thionamide drugs and perchlorate on thyroid stimulating immunoglobulins in Graves'disease: evidence against an immunosuppressive action of thionamide drugs. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984 58:62-9.
- Wijtmans M, Verzijl D, Leurs R, de Esch IJ, Smit MJ. Towards small-molecule CXCR3 ligands with clinical potential. *Chem Med Chem.* 2008 3:861-872.
- Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 2004 351(11):1106-18.
- Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol.* 2001 78:57-110.
- Zhang X, Young HA. PPAR and immune system- what do we know? *Int Immunopharmacol.* 2002 2:1029-44.
- Zhao DX, Hu Y, Miller GG, Luster AD, Mitchell RN, Libby P. Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. *J Immunol* 2002 169:1556-1560.
- Zheng RQH, Abney E, Chu CQ, Field M, Grubeck-Lobenstein B, Maini RN, Feldmann M. Detection of IL-6 and IL-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemical methods. *Clin Exp Immunol* 1991 83:314-319.
- Zídek Z, Anzenbacher P, Kmoníčková E. Current status and challenges of cytokine pharmacology. *British Journal of Pharmacology.* 2009 157:342-361.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000 12:121-127.
- Zuckerman SH, Schreiber RD. Up-regulation of gamma interferon receptors on the human monocytic cell line U937 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Leukocyte Biol.* 1988 44:187-191.

## Methimazole inhibits CXC chemokine ligand 10 secretion in human thyrocytes

C Crescioli<sup>1</sup>, L Cosmi<sup>2</sup>, E Borgogni<sup>1</sup>, V Santarlasci<sup>2</sup>, S Gelmini<sup>1</sup>, M Sottili<sup>1</sup>, E Sarchielli<sup>4</sup>, B Mazzinghi<sup>1</sup>, M Francalanci<sup>1</sup>, A Pezzatini<sup>1</sup>, G Perigli<sup>3</sup>, G B Vannelli<sup>4</sup>, F Annunziato<sup>2</sup> and M Serio<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Clinical Pathophysiology, <sup>2</sup>Internal Medicine, Center for Research Transfer and High Education 'DENOrthe', <sup>3</sup>General Surgery Medical School and <sup>4</sup>Anatomy, Histology and Forensic Medicine, University of Florence, Florence, Italy

(Correspondence should be addressed to C Crescioli who is now at Unit of Endocrinology, Department of Clinical Pathophysiology, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy; Email: c.crescioli@dfc.unifi.it)

### Abstract

CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) plays a pivotal role in the self-perpetuation of the inflammatory processes in patients with autoimmune thyroid disease. Treatment with methimazole (MMI) reduces serum CXCL10 in patients with Graves' disease. In isolated human thyrocytes, tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$  demonstrates a potent synergistic effect on interferon (IFN) $\gamma$ -induced CXCL10 secretion. We investigated the mechanism underlying the synergism between IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  and the effect of MMI on CXCL10 secretion in human thyrocytes. A peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist, rosiglitazone (RGZ), a known inhibitor of T helper 1 (Th1)-mediated responses, was also studied for comparison. Experiments were carried out in human thyrocytes isolated from internodular parenchyma of thyroid tissues derived from patients who had undergone surgery for multinodular goiter. ELISA was used to measure CXCL10 levels in culture supernatant. Flow cytometry was

used to assess IFN $\gamma$  membrane receptor expression. Specific mRNA analysis was performed by Taqman real-time PCR. Immunofluorescence was performed to detect nuclear translocation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). In human thyrocytes, the synergistic effect of TNF $\alpha$  with IFN $\gamma$  on CXCL10 secretion is due to the upregulation of IFN $\gamma$  receptor expression. MMI decreased cytokine-induced CXCL10 secretion by reducing TNF $\alpha$ -induced upregulation of the IFN $\gamma$  receptor. RGZ decreased the cytokine-induced CXCL10 secretion by impairing NF- $\kappa$ B translocation, without affecting IFN $\gamma$  receptor. MMI and RGZ targeted thyrocytes with the same pharmacological potency, likely acting throughout different mechanisms. Targeting T helper 1-mediated autoimmune thyroid disease with drugs that impair different intracellular pathways could be a novel pharmacological tool.

*Journal of Endocrinology* (2007) 195, 145–155

### Introduction

In the pathogenesis of human autoimmune thyroid disorders (AITDs), Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease (GD), intrathyroidal lymphocytes seem to play a central role since thyroid antigen recognition is an essential step to T- and/or B-cell stimulation (Weetman & McGregor 1994). The T-cell pattern involved in GD might change throughout the disease course, with T helper 1 (Th1) as the predominant subtype of CD4<sup>+</sup>T cells in patients with recent disease onset and Th2 as the predominant subtype in patients with longer disease duration (Aniszewski *et al.* 2000).

In AITDs, a wide range of Th1-associated cytokines, such as interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, interferon (IFN) $\gamma$ , and tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ , are produced. The cytokine production in AITDs has been ascribed to infiltrating T cells, macrophages (Weetman 2003), thyrocytes (Watson *et al.* 1995, Weetman 2004), and endothelial cells (Romagnani *et al.* 2002). The active phase of the disease is characterized by

the presence of proinflammatory and Th1-derived cytokines in the thyroid gland, whereas Th2-derived cytokines do not seem to be involved (Wakelkamp *et al.* 2003).

Chemokines, a group of low-molecular-weight peptides belonging to the cytokine family, are known to induce the chemotaxis of different leucocyte subtypes (Zlotnik & Yoshie 2000). The CXC chemokines inducible by IFN $\gamma$  – CXCL9, CXCL10, and CXCL11 – are associated with Th1-mediated immune responses (Antonelli *et al.* 2006a). CXCL10, in particular, has been identified as a prototypic chemokine involved in the pathogenesis of glandular autoimmunity (Romagnani *et al.* 2002, Rotondi *et al.* 2003, Antonelli *et al.* 2004, 2005). Indeed, CXCL10 and its CXCR3 receptor play a pivotal role in the initial phases of AITDs (Romagnani *et al.* 2002, Kemp *et al.* 2003). In patients with GD, CXCL10 was detected in thyrocytes and endothelial and inflammatory cells, which also expressed peculiarly a large amount of CXCR3 (Garcia-Lopez *et al.* 2001, Romagnani *et al.* 2001, Aust *et al.* 2002, Kemp *et al.* 2003, Antonelli *et al.* 2004, 2005).



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



[www.elsevier.com/locate/yexcr](http://www.elsevier.com/locate/yexcr)



Research Article

## Immunosuppression in cardiac graft rejection: A human in vitro model to study the potential use of new immunomodulatory drugs

Clara Crescioli<sup>a,\*</sup>, Roberta Squecco<sup>b</sup>, Lorenzo Cosmi<sup>a</sup>, Mariangela Sottili<sup>a</sup>, Stefania Gelmini<sup>a</sup>, Elisa Borgogni<sup>a</sup>, Erica Sarchielli<sup>c</sup>, Sabino Scolletta<sup>d</sup>, Fabio Francini<sup>b</sup>, Francesco Annunziato<sup>a</sup>, Gabriella Barbara Vannelli<sup>c</sup>, Mario Serio<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Center for Research Transfer and High Education "DENOTE", University of Florence, Florence, Italy

<sup>b</sup>Department of Physiological Sciences, University of Florence, Florence, Italy

<sup>c</sup>Department of Anatomy, Histology and Forensic Medicine, University of Florence, Florence, Italy

<sup>d</sup>Department of Surgery and Bioengineering, University of Siena, Siena, Italy

### ARTICLE INFORMATION

#### Article Chronology:

Received 12 October 2007

Revised version received

20 December 2007

Accepted 20 December 2007

Available online 4 January 2008

#### Keywords:

Cardiomyocytes

CXCL10

Allograft rejection

Immunosuppressors

### ABSTRACT

CXCL10–CXCR3 axis plays a pivotal role in cardiac allograft rejection, so that targeting CXCL10 without inducing generalized immunosuppression may be of therapeutic significance in allotransplantation. Since the role of resident cells in cardiac rejection is still unclear, we aimed to establish reliable human cardiomyocyte cultures to investigate Th1 cytokine-mediated response in allograft rejection. We used human fetal cardiomyocytes (Hfcm) isolated from fetal hearts, obtained after legal abortions.

Hfcm expressed specific cardiac lineage markers, specific cardiac structural proteins, typical cardiac currents and generated ventricular action potentials.

Thus, Hfcm represent a reliable in vitro tool for allograft rejection research, since they resemble the features of mature cells. Hfcm secreted CXCL10 in response to IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ; this effect was magnified by cytokine combination. Cytokine synergy was associated to a significant TNF $\alpha$ -induced up-regulation of IFN $\gamma$ R.

The response of Hfcm to some currently used immunosuppressive drugs compared to rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist and Th1-mediated response inhibitor, was also evaluated. Only micophenolic acid and rosiglitazone halted CXCL10 secretion by Hfcm.

Given the pivotal role of IFN $\gamma$ -induced chemokines in Th1-mediated allograft rejection, these preliminary results suggest that the combined effects of immunosuppressive agents and rosiglitazone could be potentially beneficial to patients receiving heart transplants.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

\* Corresponding author. Department Clinical Pathophysiology, Unit of Endocrinology University of Florence Viale Pieraccini, 6–50139 Florence, Italy. Fax: +39 055 4271371.

E-mail address: [c.crescioli@dfc.unifi.it](mailto:c.crescioli@dfc.unifi.it) (C. Crescioli).

0014-4827/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.yexcr.2007.12.016

## Elocalcitol Inhibits Inflammatory Responses in Human Thyroid Cells and T Cells

E. Borgogni,\* E. Sarchielli,\* M. Sottili, V. Santarlasci, L. Cosmi, S. Gelmini, A. Lombardi, G. Cantini, G. Perigli, M. Luconi, G. B. Vannelli, F. Annunziato, L. Adorini, M. Serio, and C. Crescioli

Departments of Clinical Pathophysiology (E.B., M.So., S.G., A.L., G.C., M.L., M.Se., C.C.) and Internal Medicine (V.S., L.C., F.A.), Center for Research Transfer and High Education "DENOthe" (De Novo Therapies), Department of Anatomy, Histology and Forensic Medicine (E.S., G.B.V.), General Surgery Medical School (G.P.), University of Florence, 6-50139 Florence, Italy; and BioXell (L.A.), 20132 Milan, Italy

T-helper 1 (Th1) cell-mediated inflammatory responses predominate in the early pathogenesis of Graves' disease (GD), whereas Th2 cell-mediated immunity may play a role in later stages. The chemokine CXCL10 and its receptor CXCR3 are expressed in most thyroid glands of early GD patients. Circulating CXCL10 levels inversely correlate with disease duration; CXCL10 maximal expression also correlates with interferon (IFN) $\gamma$  levels in recent GD onset. Methimazole (MMI) reduces CXCL10 secretion by isolated thyrocytes, decreases serum CXCL10 levels, and promotes a transition from Th1 to Th2 dominance in patients in GD active phase. Vitamin D receptor agonists exhibit antiinflammatory properties and promote tolerance induction. We investigated the effects and the mechanism of action of a nonhypercalcemic vitamin D receptor agonist, elocalcitol (BXL-628), compared with MMI on CXCL10 secretion induced by proinflammatory cytokines.

Furthermore, we studied the effects of both drugs on Th1, Th17, and Th2 cytokine secretion in CD4<sup>+</sup> T cells. ELISA, cytometry, immunocytochemistry, Western blot, and quantitative real-time PCR were used for protein and gene analysis. In human thyrocytes, elocalcitol inhibited IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ -induced CXCL10 protein secretion more potently than MMI. Elocalcitol impaired both cytokine intracellular pathways, whereas MMI was effective only on the IFN $\gamma$  pathway. In CD4<sup>+</sup> T cells, elocalcitol decreased Th1- and Th17-type cytokines, and promoted Th2-type cytokine secretion. Elocalcitol and MMI inhibited Th1 cytokine-mediated responses in thyrocytes and CD4<sup>+</sup> T cells. In addition, elocalcitol promoted a shift toward a Th2 response. In conclusion, elocalcitol could represent a novel pharmacological tool in the treatment of autoimmune thyroid diseases. (*Endocrinology* 149:3626–3634, 2008)

**A**LTHOUGH GRAVES' disease (GD) has long been considered a T-helper 2 (Th2)-mediated autoimmune disease, a large body of evidence suggests Th1 rather than Th2 dominance in its initial phase. The predominant cell pattern involved in GD might, indeed, change throughout the disease course, with Th1 dominance at disease onset, and Th2 later on (1). CXCR3-expressing Th1 lymphocytes and the corresponding ligand, interferon (IFN) $\gamma$ -inducible protein (CXCL10), were detected in the thyroid gland of patients with recent disease onset (2). In addition, CXCL10 serum levels were significantly increased in GD patients at disease initiation (2) and with active Graves' ophthalmopathy (3). CXCL10 is a CXC chemokine inducible by IFN $\gamma$ , as CXCL9 and CXCL11, which controls leukocyte recruitment from blood (4) and is associated with Th1-mediated immune responses (5). In particular, CXCL10 has been identified as a

prototypic chemokine involved in the pathogenesis of glandular autoimmunity (2, 6–9), and the thyroid itself seems the main site of its secretion, perpetuating the Th1-mediated autoimmune cascade in autoimmune thyroid diseases (AITDs) (2, 8, 10–13). In isolated thyrocytes CXCL10 secretion is synergistically sustained by IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  (3, 13, 14), and the mechanism underlying cytokine synergy is linked to a significant up-regulation of IFN $\gamma$  receptor (IFN $\gamma$ R) driven by TNF $\alpha$  (14).

We have previously shown that methimazole (MMI) can revert Th1 cytokine-mediated CXCL10 secretion in thyroid cells by dampening the mechanism underlying cytokine synergy (14). Antithyroid drugs have interfered with immunological signals associated with GD hyperthyroidism (15, 16). In particular, decreased CXCL10 serum levels (17) and a transition from Th1 to Th2 dominance have been reported in hyperthyroid patients with GD in the active phase (18) treated with MMI. However, its mechanism of action still remains to be elucidated fully.

Recently, vitamin D receptor (VDR) agonists have exerted pleiotropic activities in immune regulation (19, 20). VDR agonists have been effective in several models of autoimmune disease (21). They are currently clinically exploited for the topical treatment of psoriasis, a Th1 cell-mediated autoimmune disease of the skin (22), but recent advances in understanding their immunomodulatory mechanisms suggest a wider applicability in the treatment of autoimmune diseases. In particular, the antiinflammatory properties of

First Published Online March 27, 2008

\* E.B. and E.S. contributed equally to this work.

Abbreviations: Ab, Antibody; AITD, autoimmune thyroid disease; GD, Graves' disease; I, Ionomycin; ID, identification; IFN, interferon; IFN $\gamma$ R, IFN $\gamma$  receptor; I $\kappa$ B, inhibitor  $\kappa$ B; mAb, monoclonal antibody; MMI, methimazole; NF, nuclear factor; P, Phorbol 12-myristate 13-acetate; pNF- $\kappa$ B, phospho Ser536 nuclear factor- $\kappa$ B; pStat1, phospho Tyr701 signal transducer and activator of transcription 1; Stat, signal transducer and activator of transcription; Tg, thyroglobulin; Th1, Th2, or Th17, T-helper 1, 2, or 17; VDR, vitamin D receptor.

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



[www.elsevier.com/locate/yexcr](http://www.elsevier.com/locate/yexcr)



Research Article

## Immunomodulatory effects of BXL-01-0029, a less hypercalcemic vitamin D analogue, in human cardiomyocytes and T cells

M. Sottili<sup>a</sup>, L. Cosmi<sup>a</sup>, E. Borgogni<sup>a</sup>, E. Sarchielli<sup>b</sup>, L. Maggi<sup>a</sup>, M. Francalanci<sup>a</sup>, G.B. Vannelli<sup>b</sup>, E. Ronconi<sup>a</sup>, L. Adorini<sup>c</sup>, F. Annunziato<sup>a</sup>, P. Romagnani<sup>a</sup>, M. Serio<sup>a</sup>, C. Crescioli<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Excellence Center for Research Transfer and High Education 'DENOthe', University of Florence, Italy

<sup>b</sup>Department of Anatomy, Histology and Forensic Medicine, University of Florence, Italy

<sup>c</sup>BioXell, Milano, Italy

ARTICLE INFORMATION

**Article Chronology:**  
 Received 14 July 2008  
 Revised version received  
 23 October 2008  
 Accepted 24 October 2008  
 Available online 5 November 2008

**Keywords:**  
 Heart transplantation  
 CXCL10  
 Immunosuppression  
 Vitamin D analogue  
 Mycophenolic acid

ABSTRACT

Current immunosuppressive protocols have reduced rejection occurrence in heart transplantation; nevertheless, management of heart transplant recipients is accompanied by major adverse effects, due to drug doses close to toxic range. In allograft rejection, characterized by T-helper 1 (Th1) cell-mediated response, the CXCL10–CXCR3 axis plays a pivotal role in triggering a self-promoting inflammatory loop. Indeed, CXCL10 intragraft production, required for initiation and development of graft failure, supports organ infiltration by Th1 cells. Thus, targeting the CXCL10–CXCR3 axis while avoiding generalized immunosuppression, may be of therapeutic significance. Based on preclinical evidence for immunoregulatory properties of vitamin D receptor agonists, we propose that a less hypercalcemic vitamin D analogue, BXL-01-0029, might have the potential to contribute to rejection management. We investigated the effect of BXL-01-0029 on CXCL10 secretion induced by proinflammatory stimuli, both in human isolated cardiomyocytes (Hfcm) and purified CD4+ T cells. Mycophenolic acid (MPA), the active agent of mycophenolate mofetil, was used for comparison. BXL-01-0029 inhibited IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ -induced CXCL10 secretion by Hfcm more potently than MPA, impairing cytokine synergy and pathways. BXL-01-0029 reduced also CXCL10 protein secretion and gene expression by CD4+ T cells. Furthermore, BXL-01-0029 did not exert any toxic effect onto both cell types, suggesting its possible use as a dose-reducing agent for conventional immunosuppressive drugs in clinical transplantation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Allograft rejection (AR)–either acute or chronic–remains the major concern after heart transplantation (HTx), although immunosuppressive regimens have significantly reduced its occurrence. However, current immunosuppressants have little or no impact on the long-term rate of graft loss and may themselves contribute to

chronic graft rejection [1]. Conventional immunosuppressive drugs are, indeed, effective at doses close to the toxic range. In addition, the high level of the different drug combination to suppress the general inflammatory processes involved in AR causes numerous side effects [2].

T helper 1 (Th1) cell recruitment and retention in cardiac allografts critically participate in the development of AR, which is

\* Corresponding author. Department Clinical Pathophysiology, Unit of Endocrinology, University of Florence, Viale Pieraccini, 6 – 50139 Florence, Italy. Fax: +39 055 4271371.

E-mail address: [c.crescioli@dfc.unifi.it](mailto:c.crescioli@dfc.unifi.it) (C. Crescioli).

0014-4827/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.  
 doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.025