

Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Fisiopatologia Clinica

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie
Endocrinologiche, Molecolari e Rigenerative
XXIV Ciclo

Tesi di Dottorato

**Ruolo dei linfociti Th17 e dei loro precursori
in pazienti con psoriasi volgare prima e dopo
il trattamento con farmaci biologici**

Settore disciplinare MED/35

Candidato
Dr. Emiliano Antiga

Correlatore
Prof. Claudio Orlando

Coordinatore
Prof. Gianni Forti

Indice

Capitolo 1.	<i>La psoriasi</i>	pag. 3
Capitolo 2.	<i>I linfociti Th17</i>	pag.36
Capitolo 3.	<i>Scopo della ricerca</i>	pag.47
Capitolo 4.	<i>Materiali e metodi</i>	pag.50
Capitolo 5.	<i>Risultati</i>	pag.58
Capitolo 6.	<i>Discussione</i>	pag.70
Capitolo 7.	<i>Bibliografia</i>	pag.79
Capitolo 8.	<i>Appendice iconografica</i>	pag.88

Capitolo 1

La psoriasi

1.1 Definizione

La psoriasi è una comune malattia infiammatoria, a decorso cronico-recidivante, caratterizzata da lesioni cutanee polimorfe (eritemato-squamose, pustolose e infiltrative), che nelle forme più comuni si localizzano in sede tipica. Altrettanto tipico è il quadro istopatologico in gran parte caratterizzato dall'accelerato turnover dei cheratinociti epidermici e dall'exocitosi di linfociti e di granulociti neutrofili.¹

La psoriasi viene attualmente considerata un'affezione a carattere sistemico per il coinvolgimento di numerosi organi e apparati determinata dall'associazione di fattori genetici predisponenti e di fattori ambientali scatenanti capaci di innescare una reazione immunologica specifica mediata prevalentemente da linfociti T.¹

1.2 Clinica

La prevalenza della psoriasi in Europa e negli USA varia dal 1% al 4% della popolazione totale e dal 6% al 12% dei pazienti dermatologici. La razza bianca è la più frequentemente colpita, mentre molto rara è l'incidenza nelle popolazioni di colore. La malattia è praticamente assente fra gli eschimesi e gli indiani d'America. In Italia la prevalenza della psoriasi nell'età adulta viene valutata intorno al 3-4%. Le forme gravi di psoriasi rappresenterebbero circa il 10%, con un grave impatto sulla qualità di vita dei pazienti.²

La psoriasi colpisce i due sessi con uguale frequenza nell'età adulta, tuttavia in età infantile e giovanile le femmine sono più colpite tra i 5 e i 9 anni, mentre i maschi tra i 15 e i 19 anni. Nei bambini compare spesso in modo eruttivo dopo un'infezione streptococcica. Una familiarità è dimostrabile in più di un terzo dei pazienti.

Pur potendo manifestarsi in qualunque età, sono stati riscontrati due picchi di insorgenza: uno precoce (16-22 anni) ed uno tardivo (57-60 anni). I soggetti con familiarità per psoriasi mostrano la tendenza ad un esordio precoce ed il rischio di sviluppare la psoriasi nel corso della vita risulta 3 volte maggiore nei discendenti dei soggetti affetti precocemente da questa malattia, rispetto ai discendenti di coloro che l'avevano sviluppata dopo i 30 anni. L'esordio precoce si accompagna anche ad una maggiore gravità delle manifestazioni.²

La psoriasi nella sua più comune espressione clinica, **psoriasi volgare** (PV), si caratterizza per la comparsa eruttiva di una o più chiazze di dimensioni variabili, a limiti netti, inizialmente eritematose, che in breve tempo si coprono di un cumulo di squame bianco-argentee, friabili. Una tipica manovra semeiologica (grattamento metodico di Brocq) permette di mettere in evidenza alcuni tipici "segni" di grande importanza per la diagnosi. Più precisamente possono essere dimostrati in successione: segno della goccia di cera, col grattamento vengono asportate le squame più superficiali che appaiono secche e friabili come la cera, mentre le sottostanti squame appaiono più brillanti e di un intenso colore bianco-argenteo per la penetrazione di aria tra le squame; segno della membrana di Duncan-Bulkley, se il grattamento continua dopo aver asportato completamente il cumulo squamoso si evidenzia una membranella rosea, lucida ed umida, che si lascia asportare in blocco e che corrisponde agli strati più bassi dell'epidermide

localizzati immediatamente al di sopra del derma papillare; segno della rugiada sanguigna di Auspitz, proseguendo il grattamento si provoca la rottura dei capillari del derma papillare, che si manifesta con la comparsa di una emorragia puntiforme.

Le chiazze psoriasiche possono assumere dimensioni diverse da qualche millimetro a molti centimetri di diametro, ma di solito sono abbastanza uniformi in uno stesso soggetto. Per questo sono state distinte numerose varietà morfologiche di psoriasi (*Tabella I*).

Tabella I. Classificazione della psoriasi volgare in base alle dimensioni delle lesioni.¹

Psoriasi puntata	Lesioni puntiformi, (varietà caratteristica della psoriasi esantematica post-streptococcica).
Psoriasi guttata	Lesioni della grandezza di una goccia (varietà caratteristica delle forme infantili post streptococciche).
Psoriasi follicolare	Lesioni inizialmente localizzate a livello dei follicoli con aspetto simile al lichen planus. Rara (frequente nei bambini).
Psoriasi nummulare	Lesioni delle dimensioni di una moneta.
Psoriasi circinnata	Lesioni ad anello per risoluzione centrale.
Psoriasi a carta geografica	Lesioni di grandi dimensioni a contorni irregolari che ricordano una mappa geografica.
Psoriasi minima e atipica	Lesioni di modesta entità, spesso recidivanti e autorisolventesi, localizzate in sede elettiva o anomala (palpebre, sopracciglio, padiglioni e meati auricolari, ascelle).

La PV può, inoltre, essere distinta sulla base dell'estensione delle lesioni (circoscritta, diffusa, generalizzata o universale) e sulla base del decorso (forme a decorso cronico-recidivante, a decorso acuto, forme eruttive e forme esantematiche). La psoriasi esantematica è rara senza sedi preferenziali di

localizzazione ma con distribuzione simmetrica. Questa varietà morfologicamente di tipo puntato è frequente nei bambini, specialmente dopo un'infezione streptococcica.

Qualsiasi area corporea può essere colpita dalla PV, ma le localizzazioni preferenziali sono rappresentate dalle regioni estensorie degli arti, in particolare dai punti di appoggio (gomiti, ginocchi), dal cuoio capelluto e dalla regione sacrale. Altre zone frequentemente interessate sono quelle soggette a sfregamento come la piega interglutea e l'area perineale. È importante sottolineare che nella fase di attività della malattia qualsiasi trauma, anche modesto, è capace di evocare nel giro di 10-15 giorni la comparsa di tipiche manifestazioni psoriasiche: isomorfismo reattivo o fenomeno di Koebner.

La PV può assumere, in particolare sedi, caratteristiche morfologiche specifiche che sono precisate nella Tabella II.

Tabella II. Psoriasi volgare: localizzazioni particolari.¹

Psoriasi del cuoio capelluto
Localizzazione prevalentemente ai margini di inserzione dei capelli, si estende di 1-2 cm sulla cute glabra. Si può associare con dermatite seborroica e "sebopsoriasi" ed interessare il volto (palpebre, aree seborroiche).
Psoriasi delle pieghe
Nel 30% circa dei pazienti con PV si ha interessamento delle pieghe inguino-crurali, ascellari, sottomammarie, perineali, interdigitali. In queste sedi l'attrito meccanico (fenomeno di Koebner) e l'infezione da <i>Candida albicans</i> sono spesso i fattori scatenanti di una psoriasi latente. Può essere presente prurito. Mancano in genere le squame e la lesione caratteristica è una chiazza eritematosa, liscia, lucente, accompagnata da macerazione e ragadi. Quando, oltre alle grandi pieghe, sono interessate le superfici flessorie delle braccia e delle gambe, anziché quelle estensorie, si parla di psoriasi inversa .
Psoriasi dei genitali
Spesso è presente una chiazza unica, fissa, a limiti netti con squame scarse o assenti. Importante è la diagnosi differenziale con il morbo di Bowen, la balanite di Zoon e l'eritroplasia.

Psoriasi palmare e plantare
La PV si manifesta a livello delle aree palmo-plantari con lesioni eritemato-infiltrative a limiti netti, ricoperte da squame bianco-giallastre fortemente aderenti, che possono complicarsi con ragadi dolenti. Può essere scatenata da stimoli traumatici anche professionali. Difficile la diagnosi differenziale con l'eczema ipercheratosico.
Psoriasi delle unghie
Un interessamento ungueale è presente in circa il 40-45% degli psoriasici ed in più del 70% dei casi di psoriasi artropatica. Le unghie possono essere una localizzazione esclusiva. Le alterazioni ungueali sono rappresentate da depressioni puntiformi, scanalature longitudinali della lamina, accumulo sub ungueale di materiale ipercheratosico "a zoccolo", onicolisi, discromie giallastre o rosa salmone "a macchia d'olio" (di Grotton).
Psoriasi delle mucose e delle pseudomucose
L'interessamento della mucosa orale è presente, anche se molto raramente, solo nella psoriasi pustolosa generalizzata. Nella PV il dorso della lingua può presentare lesioni eritematose, lisce per atrofia delle papille (lingua a carta geografica) o solcature (lingua scrotale).

Generalmente la PV non si accompagna a sintomi generali; il prurito in genere è assente o modesto, ma può essere pronunciato durante la fase eruttiva o in seguito a certi trattamenti topici irritanti (antralina o catrame) o se associato a labilità emozionale, alcolismo e alterazioni metaboliche (diabete, etc.). Il prurito è inoltre frequente nei giovani con PV eruttiva esantematica. Come abbiamo rilevato il decorso della PV è abitualmente cronico-ricidivante caratterizzato, cioè da periodi di latenza di durata variabile, con scarsi elementi o addirittura senza manifestazioni cliniche evidenti e periodi di esarcebazione. Più raramente può persistere invariata spesso accantonata in alcune aree cutanee, senza regredire, ma anche senza peggiorare (PV cronica stazionaria). Nella PV eruttiva esantematica si può avere con frequenza una regressione spontanea. Accanto alla PV devono essere considerate altre varietà cliniche che abbiamo definito con il termine di "forme speciali" di psoriasi, tra cui si ricordano:

- **Psoriasi eritrodermica:** Forma particolarmente severa, presente nell'1-2% dei pazienti. È frequentemente scatenata da farmaci, dalla sospensione

di corticosteroidi sistemici (talora anche topici), da infezioni acute, da stress emotivi. Interessa oltre il 90% della superficie cutanea, che si mostra intensamente flogistica con eritema, edema, desquamazione e formazione di squamo-croste. Spesso è presente una severa onicopatia, intenso prurito, sensazione di freddo e malessere generale. La perdita di liquidi, elettroliti e proteine causa importanti alterazioni sistemiche. Temibili complicanze sono le infezioni stafilococciche sistemiche e le polmoniti virali o batteriche.

- **Psoriasi pustolosa localizzata:** *Palmo-plantare cronica* (PPP) – tipo Barber. Forma frequente, a decorso cronico, resistente alla terapia, caratterizzata da pustole sterili delle superfici palmari (eminenza tenar e ipotenar) e delle superfici plantari; può essere associata a manifestazioni, anche minime, di PV in sedi classiche. Le pustole giallo-brunastre sono piatte e incassate nella cute ed essiccandosi esitano in squamo croste. *Palmo-plantare acuta* – batteride pustoloso di Andrews. Forma rara, caratterizzata da un'eruzione monomorfa di numerose pustole sterili palmo-plantari; occasionalmente può essere messa in relazione con un'infezione batterica, ma di solito si tratta semplicemente di una variante acuta di PPP. *Acrodermatite continua di Hallopeau*. Variante di PP acuta che interessa l'ultima falange delle dita delle mani e dei piedi, con frequente e grave compromissione ungueale e più rara osteolisi della falange distale.
- **Psoriasi pustolosa generalizzata:** *Tipo von Zumbusch*. Eruzione acuta disseminata di piccole pustole sterili, recidivanti, puntiformi, biancastre su cute eritemato-edematosa, sub eritrodermica. Interessa anche la mucosa

orale e genitale ed è accompagnata da febbre, artralgie, mialgie, astenia. *Impetigo herpetiformis di Hebra* (o della gravidanza), rara eruzione pustolosa generalizzata, che si manifesta nel 3° trimestre di gravidanza ed è correlata ad ipoparatiroidismo e ad ipocalcemia. *Tipo eritema anulare* (eritema ricorrente marginato di Lapière): eruzione circoscritta o più frequentemente diffusa di placche eritematose circinate con risoluzione centrale e presenza di pustole alla periferia. È la più comune forma di psoriasi pustolosa dell'infanzia ed ha andamento benigno.

- ***Psoriasi volgare con pustole:*** Una o più placche di PV presente da anni sviluppano pustole in seguito a terapie topiche irritanti.
- ***Psoriasi artropatica (osteo-artro-entesiopatia infiammatoria associata a psoriasi):*** *Forma oligoarticolare o simmetrica*, è la varietà più frequente (70% dei casi) con interessamento interfalangeo distale delle mani e dei piedi. In caso di interessamento tenosinoviale le dita assumono un aspetto “a salsicciotto”. *Artrite mutilante e anchilosante*, interessa mani, piedi, colonna vertebrale. Questa forma è rara e particolarmente grave per le erosioni ossee fino all'osteolisi e per l'evoluzione anchilosante e deformante. *Poliartrite simmetrica* (simil-reumatoide), caratterizzata da rigidità mattutina, interessamento simmetrico delle articolazioni delle mani e delle articolazioni sacroiliache con isolate distruzioni articolari, ma con fattore reumatoide negativo. Nella psoriasi artropatica sono frequenti sia l'interessamento ungueale (onicopatia psoriasica) che lesioni infiammatorie oculari.

1.3 Istopatologia

La cute nella psoriasi volgare presenta una tipica architettura caratterizzata da una spiccata acantosi con creste epidermiche allungate a forma di clava, cui corrisponde un allungamento delle papille dermiche, che appaiono edematose e coperte da pochi strati di cellule epiteliali appiattite. È documentabile un'ipercheratosi molto accentuata, accompagnata da paracheratosi con scomparsa dello strato granuloso. Questa alterazione, così tipica della cheratinizzazione, è correlata ad un'aumentata proliferazione epidermica, con incremento di 4-5 volte delle mitosi cheratinocitarie e conseguente ispessimento dell'epidermide; per questo motivo i cheratinociti della cute lesionale presentano alcuni tipici marker di proliferazione, come l'espressione del Ki-67, la formazione delle cheratine 6 e 16 e la prematura sintesi di involucrina. Inoltre la cute psoriasica, sia sana che ammalata, mostra un'aumentata attività proliferativa quando viene trapiantata su topi nudi. Sono inoltre dimostrabili accumuli di granulociti neutrofili nello strato corneo ispessito (microascessi di Munro-Sabouraud).³

Nel derma papillare è abitualmente rilevabile edema, capillari tortuosi ed ectasici e venulizzazione delle anse capillari, con un infiltrato perivascolare costituito da neutrofili, linfociti e monociti e macrofagi. Particolare attenzione è stata posta alla dinamica delle alterazioni istopatologiche: molti Autori concordano nel ritenere che alterazioni infiammatorie dermiche (vasodilatazione, edema papillare, infiltrato leucocitario) precedono la proliferazione epidermica. Recentemente è stato enfatizzato il ruolo delle modificazioni del microcircolo: precocissimo il rigonfiamento delle cellule endoteliali e la formazione di lacune tra endotelioцитi contigui, seguito dalla comparsa di mastociti degranulati e di cellule infiltranti perivascolari.³

La lesione iniziale, delle dimensioni di una capocchia di spillo (*pre pin point lesion*), mostra insieme alle alterazioni vascolari e all'edema papillare, un'intensa migrazione di cellule, principalmente linfociti, nell'epidermide, accompagnato a edema intercellulare (spongiosi).

La psoriasi pustolosa, in tutte le sue varietà, si caratterizza sul piano istologico per la presenza, insieme alle alterazioni descritte in precedenza a carico dell'epidermide e del derma, delle cosiddette pustole spongiformi di Kogoj caratterizzate da un notevole accumulo di granulociti neutrofili nel contesto dello strato malpighiano edematoso e con numerose lacune intercellulari.³

1.4 Eziologia

La psoriasi viene attualmente considerata una malattia determinata dalla combinazione di fattori genetici predisponenti e di fattori ambientali scatenanti, i quali devono essere considerati soltanto *trigger factors*.⁴ Tra questi **fattori scatenanti**, una particolare importanza deve essere attribuita ai traumi fisici, alle infezioni ed ai farmaci. Una lunga serie di azioni traumatizzanti fisiche e chimiche può determinare la comparsa della psoriasi: dalle abrasioni traumatiche alle punture di insetti, dall'applicazione di sostanze irritanti alle ustioni chimiche, dai traumi chirurgici all'azione di radiazioni ionizzanti o UV, dal semplice sfregamento ripetuto all'esecuzione di tatuaggi o vaccini. La possibilità di indurre la malattia, in conseguenza di queste azioni traumatiche fisiche e chimiche, è nota col termine di reazione isomorfa o fenomeno di Koebner (FK);⁵ anche la possibile comparsa di psoriasi in aree cutanee sede di pregresse malattie infiammatorie (herpes zoster, lichen planus, pitiriasi rosea, vitiligine, eczema, etc.) è stata

considerata come un FK interpretato nella sua accezione più estensiva. Il FK si realizza molto più frequentemente nelle fasi di attività della malattia; in studi retrospettivi è stato documentato in una percentuale variabile dal 30% al 50% dei pazienti con PV. Nei pazienti, nei quali è possibile indurre il FK, la psoriasi presenta una maggiore resistenza alla terapia ed un più rapido esordio. Molto più raramente è stato osservato un effetto esacerbante la malattia indotto dal congelamento o dall'esposizione alle radiazioni solari o artificiali ultraviolette. Come noto, nella maggior parte dei pazienti psoriasici l'esposizione a queste radiazioni naturali o artificiali ha un'azione favorevole sulle manifestazioni cutanee, tuttavia in una piccola percentuale di casi (5-6%) l'effetto può essere opposto (induzione o aggravamento di una psoriasi pre-esistente). Questi quadri cutanei scatenati dalla fotoesposizione vengono definiti **psoriasi fotosensibile** (pf). La pf colpisce soprattutto soggetti di sesso femminile con fototipo I e presenta un decorso recidivante. In uno studio recente è stato precisato che circa il 50% dei pazienti con pf presentava un'eruzione polimorfa solare (EPS) che precedeva la comparsa delle lesioni psoriasiche nelle stesse sedi di localizzazione, mentre nell'altra metà dei soggetti esaminati le manifestazioni psoriasiche erano insorte lentamente dopo fotoesposizione senza essere precedute da EPS.¹ Anche le infezioni, specie delle alte vie respiratorie, sono state considerate da tempo capaci di condizionare la comparsa della malattia o di peggiorarla nel suo decorso, in percentuali variabili dal 15% al 76% dei casi. In particolare la forma di psoriasi guttata acuta nei bambini consegue, in una percentuale variabile dal 56% all'85% dei casi, ad un'infezione streptococcica delle tonsille o del faringe.⁶ Lo *Streptococcus pyogenes* (β -emolitico, gruppo A) è considerato il più importante *trigger factor*, isolabile in seguito all'esecuzione di tampone faringeo nel 26% dei pazienti con psoriasi guttata acuta e nel 16% dei pazienti con una

forma di psoriasi cronica. I sierotipi dello streptococco, isolati nei pazienti psoriasici, non differivano da quelli dimostrabili nei soggetti di controllo.⁶ Anche l'infezione HIV può rappresentare un importante fattore scatenante della psoriasi, che può presentarsi sia in forma di psoriasi volgare (guttata o in larghe placche) che come una dermatite psoriasiforme diffusa. L'infezione da HIV si è dimostrata capace di dare inizio alla malattia ed anche di determinare la rapida ed estesa riacutizzazione, spesso di notevole gravità, di una psoriasi persistente. Infine tra gli agenti virali, di recente è stato attribuito un importante ruolo scatenante ad infezioni esantematiche come il morbillo e la varicella, ad infezioni da herpes zoster e soprattutto ad infezioni HPV-correlate. Tra i farmaci, capaci di scatenare o riacutizzare la psoriasi, vengono riportati gli antimalarici di sintesi, il litio, i farmaci anti-ipertensivi (β -bloccanti e ACE inibitori). Inoltre, la repentina sospensione di corticosteroidi sistemici può provocare l'improvviso e rapido aggravamento della malattia (o un suo viraggio verso una forma eritrodermica o pustolosa) mentre l'uso di corticosteroidi locali, specie se fluorurati, può aggravare una forma di PV o determinare la comparsa di pustole.

Numerose evidenze cliniche sembrano suggerire non solo nei pazienti adulti, ma anche nei bambini, l'importanza di *stressors* psicosomatici.⁷ Tuttavia, numerose ricerche in questo settore non hanno documentato negli psoriasici né disordini della personalità, né tratti psicologici ben definiti. Tra gli argomenti a favore di un ruolo scatenante dei fattori psicogeni si ricorda: la prevalenza del sintomo prurito, assente nella descrizione classica della malattia ma riferito con elevata frequenza nei soggetti psoriasici in seguito a stress emotivi; la scomparsa della malattia (o la sua netta riduzione statistica) quando gli individui si trovano ad affrontare pericoli reali e non immaginari, come durante i periodi bellici; il miglioramento della

dermatosi in coincidenza con periodi di riposo, di vacanza, di abbandono delle preoccupazioni e dei conflitti legati all'ambiente di lavoro e/o familiare e un peggioramento alla ripresa della vita abituale; il miglioramento ottenuto con la psicoterapia e l'ipnoterapia anche in forme gravi di PV.

Alcune abitudini di vita, soprattutto l'abuso di alcool e il fumo di sigaretta, sono state considerate in passato condizioni scatenanti; studi epidemiologici recenti confermano la correlazione della malattia con il fumo di sigaretta, ma sembrano ridimensionare il rischio conseguente all'abuso di alcool, così come l'importanza di acidi grassi polinsaturi nella dieta.

Un peggioramento della malattia durante il periodo mestruale e in seguito all'assunzione di estrogeni ad alte dosi è stato ripetutamente segnalato, ma mancano conferme su studi controllati.

Mancano anche conferme su alcuni fattori metabolici quali ad esempio l'ipocalcemia.

Tutti i fattori scatenanti esaminati sarebbero capaci di indurre la malattia attraverso un unico meccanismo effettore: l'attivazione dei linfociti T.

Questa attivazione potrebbe conseguire alla stimolazione del sistema immunitario del soggetto da parte di antigeni batterici o virali, soprattutto se possiedono epitopi cross reattivi con componenti epidermiche come le cheratine, si veda ad esempio la proteina M e la cheratina K14 di tipo I; oppure la stimolazione potrebbe conseguire da superantigeni, ad esempio il superantigene SPEC degli streptococchi. A tale proposito è stato dimostrato, in topi SCID, che l'iniezione di immunociti periferici, stimolati da un superantigene, è sufficiente ad indurre la comparsa di lesioni psoriasiche in aree cutanee indenni di un paziente affetto da psoriasi, trapiantate su questi stessi topi. Sempre in topi SCID, trapiantati con cute

non lesionale, iniezioni intradermiche con un superantigene batterico e contemporanee iniezioni intra-peritoneali con cellule mononucleate del paziente, stimulate con lo stesso superantigene, si sono dimostrate capaci di provocare lesioni psoriasiformi.⁸ Anche l'applicazione di quantità minime di superantigeni sulla cute apparentemente sana di soggetti psoriasici è in grado di dare inizio ad una risposta infiammatoria.

È stata infine proposta nella psoriasi la possibilità di un'attivazione linfocitaria T antigene-indipendente. Secondo questa ipotesi, i cheratinociti verrebbero attivati direttamente da stimoli fisici o chimici, da tossine batteriche, da raggi UV oppure da neuropeptidi liberati a livello cutaneo con conseguente rilascio di citochine, che indurrebbero l'attivazione dei linfociti T. Queste ipotesi non sono mutualmente esclusive e possono essere diversamente operanti, in tempi differenti o in risposta a stimoli diversi.

1.5 Patogenesi⁹

Come abbiamo già rilevato, la psoriasi è determinata da fattori genetici predisponenti e da fattori ambientali scatenanti, la cui combinazione è in grado di dare l'avvio ai processi immunologici, alle alterazioni della proliferazione cheratinocitaria e ai fenomeni neoangiogenetici che caratterizzano le lesioni psoriasiche. L'importanza di **fattori genetici predisponenti** nella psoriasi è provata da numerosi studi di genetica classica riguardanti l'ereditarietà della malattia all'interno delle famiglie e la sua prevalenza in determinate popolazioni.¹⁰

È stato osservato che l'incidenza della psoriasi è più elevata nei parenti di pazienti psoriasici, rispetto alla popolazione generale, anche se le analisi di segregazione

genica non hanno mostrato un pattern di ereditarietà ben definito. In particolare, è presente una familiarità in oltre il 30% dei casi, mentre l'incidenza della malattia nella popolazione generale è del 2-3%. Inoltre, soggetti che hanno un solo genitore affetto presentano un rischio di sviluppare la psoriasi pari al 10-20%, mentre tale rischio aumenta fino ad oltre il 50% nel caso che entrambi i genitori ne siano affetti. Molto interessanti sono infine gli studi sui gemelli, che hanno dimostrato una concordanza nettamente maggiore nei gemelli monozigoti (pari al 65-72%) rispetto ai gemelli eterozigoti (15-30%).⁴

Nonostante tali evidenze, la psoriasi risulta essere una malattia molto complessa dal punto di vista genetico, in quanto caratterizzata da un'ereditarietà di tipo multifattoriale poligenico. Negli ultimi anni numerosi studi di *genome-wide linkage*, la cui capacità di identificare polimorfismi genetici è stata implementata grazie al completo sequenziamento del genoma umano, hanno tentato di definire quali fossero i geni predisponenti per la psoriasi. Tali studi hanno dimostrato la presenza di almeno 10 regioni cromosomiche, denominate *psoriasis susceptibility* (PSORS) 1-10, associate in modo statisticamente significativo al rischio di sviluppare la psoriasi.¹¹ Tra esse, la regione cromosomica maggiormente coinvolta nell'ereditarietà della psoriasi sembra essere PSORS1, localizzata nella regione 21.3 del braccio corto del cromosoma 6 (6p21.3). In tale regione, considerata responsabile di circa il 50% della suscettibilità genetica della psoriasi, sono presenti tre geni strettamente associati alla malattia: HLA-C, che codifica per una molecola appartenente al complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I; CCHCR1, che codifica per la coiled-coil α -helical rod protein, proteina con probabile ruolo regolatorio della proliferazione cheratinocitaria altamente espressa nella cute psoriasica; CDSN, che codifica per la corneodesmosina,

glicoproteina epidermica iperespressa nelle lesioni cutanee della psoriasi con un probabile ruolo nell'adesione intercorneocitaria. Tra essi il più importante è il gene HLA-C, ed in particolare il suo allele HLA-Cw6 (HLA-Cw*0602), che sembra responsabile della cosiddetta psoriasi di tipo 1, o psoriasi familiare, caratterizzata da un'età di insorgenza precoce (<40 anni), un'elevata familiarità ed un decorso clinico peggiore.¹²

L'aplotipo HLA-Cw6 si riscontra in circa il 60% dei pazienti psoriasici, mentre nella popolazione generale è presente solo nel 15% dei casi. Gli individui portatori del gene hanno un rischio 10-20 volte più elevato di sviluppare la psoriasi; inoltre, soggetti omozigoti per tale allele hanno un rischio 2,5 volte maggiore rispetto agli eterozigoti, oltre ad un'età di insorgenza della malattia più precoce. L'HLA-Cw6 sembra essere associato anche ad una maggiore estensione delle lesioni psoriasiche e ad un maggior numero di recidive. Allo stesso modo, la psoriasi guttata ed il fenomeno di Kobner sono di più frequente riscontro nei soggetti HLA-Cw6 positivi, mentre nei soggetti negativi è più facile riscontrare una psoriasi ungueale, una psoriasi pustolosa palmoplantare e una psoriasi artropatia. L'associazione della psoriasi con HLA-Cw6 supporta l'ipotesi che la malattia abbia una patogenesi prevalentemente di tipo immunomediato, dato il coinvolgimento di tale gene sia nell'immunità innata che in quella adattativa. L'HLA-Cw6 svolge un ruolo nell'immunità innata, poiché è in grado di interagire con particolari recettori, i cosiddetti *killer immunoglobulin-like receptors*, espressi su cellule NK e linfociti T NK, cellule che svolgono un ruolo di primo piano nelle risposte immuni di tipo innato e che sono implicate nella patogenesi della psoriasi. Inoltre, l'HLA-Cw6 può attivare l'immunità adattativa, in quanto questa molecola è espressa sulle cellule capaci di presentare l'antigene.

L'importanza di questo gene è confermata dal fatto che, come precedentemente ricordato, la psoriasi guttata infantile, scatenata spesso da una faringite streptococcica, si riscontra in massima parte in soggetti HLA-Cw6 positivi.¹²

Come ricordato in precedenza, si stima che la regione PSORS1 sia responsabile di circa il 50% dell'ereditarietà della psoriasi, ma non ne spiega completamente la predisposizione genetica; per questo motivo, sono stati ricercati altri geni con un potenziale ruolo nella suscettibilità della malattia. Tra essi, sono stati identificati geni espressi dai cheratinociti nelle fasi più avanzate di differenziazione, tra cui LCE3B e LCE3C1, che codificano rispettivamente per la *late cornified envelope* 3B e 3C1, e geni coinvolti nella produzione dell'IL-23 e del suo recettore, nelle risposte immunologiche che coinvolgono i linfociti Th2 (IL-4 e IL-13) il nuclear factor- κ B (NF- κ B) il *TNF- α -induced protein 3* e il *TNF- α -induced protein 3-interacting protein 1*. Questi ultimi dati confermano il ruolo di primo piano svolto dall'immunità nella patogenesi della psoriasi.⁹

Numerose evidenze sperimentali hanno precisato che l'elemento centrale nella patogenesi della psoriasi è rappresentato da un'**alterata risposta immunologica** che si esprime con un'attivazione dei linfociti T. Tale attivazione sarebbe capace di influenzare la cinetica della proliferazione epidermica, di determinare a carico di queste cellule un'anomala regolazione metabolica dei recettori e dei segnali di trasduzione trans-membranari ed infine di indurre specifiche alterazioni del microcircolo, responsabili delle caratteristiche lesioni psoriasiche. Gli elementi sperimentali e le evidenze più significative a sostegno dell'interpretazione immunologica della patogenesi della psoriasi sono rappresentate:¹³

- dalle citate associazioni tra psoriasi e geni coinvolti nell'immunità innata e adattativi, in particolare alcuni alplotipi del sistema HLA e geni che codificano per specifiche citochine;
- dalla significativa e costante presenza di cellule del sistema immunitario, in particolare cellule dendritiche e linfociti T, nelle lesioni cutanee della psoriasi;
- dal ruolo dei linfociti T e delle citochine nei modelli sperimentali di psoriasi;
- dell'espressione immunomediata sulla membrana dei cheratinociti di alcune molecole adesive;
- dalla dimostrazione di un netto miglioramento ottenuto in pazienti con psoriasi grave in seguito a trapianto di midollo, cui si contrappone la possibilità di indurre la malattia dopo trapianto di midollo da donatore psoriasico;
- dai risultati terapeutici ottenuti con farmaci capaci di controllare l'attivazione del sistema immunitario ed in particolare dei linfociti T, tra cui ciclosporina A, tacrolimus, anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD4;
- dalla confermata efficacia dei "farmaci biologici" (così chiamati perché prodotti attraverso metodiche di biologia molecolare). Tali farmaci hanno rappresentato una vera e propria rivoluzione nella terapia della psoriasi poiché il loro meccanismo d'azione, altamente selettivo, consente di ottenere degli ottimi risultati clinici con riduzione degli effetti collaterali rispetto alle terapie tradizionali.

Esistono vari tipi di farmaci biologici utilizzati nella psoriasi, distinguibili in base allo specifico bersaglio immunologico e alla loro struttura molecolare. Tra essi, la

categoria più diffusa, nonché una delle prime ad essere stata utilizzata, è quella degli inibitori del TNF- α , molecola di fondamentale importanza nella patogenesi della psoriasi, prevalentemente prodotta dalle cellule dendritiche e dai macrofagi, in grado di determinare l'attivazione dei cheratinociti e la promozione di una risposta flogistica (orientata sia verso un pattern Th1 che Th17). I farmaci biologici in grado di neutralizzare il TNF- α sono rappresentati da due anticorpi monoclonali, l'infliximab e l'adalimumab, e da una proteina di fusione di tipo recettoriale, l'etanercept. Altri farmaci biologici per la terapia della psoriasi hanno come bersaglio molecole presenti sui linfociti T, tra i quali ricordiamo l'efalizumab e l'alefacept. L'efalizumab è un anticorpo monoclonale rivolto contro il CD11a, una molecola di adesione coinvolta nel traffico linfocitario; nonostante la sua efficacia nella terapia della psoriasi, tale farmaco è stato ritirato dal commercio a causa dell'insorgenza di leucoencefalopatia multifocale progressiva in alcuni pazienti trattati. L'alefacept è invece una proteina di fusione umana che interagisce con il CD2 presente sui linfociti T, e ne impedisce il legame con LFA-3 (espresso dalle CD) e quindi prevenendone l'attivazione; tale farmaco è stato approvato dalla FDA negli Stati Uniti, mentre il suo utilizzo in Europa non è ancora permesso. Infine, molto recentemente, è stato realizzato un nuovo farmaco biologico, l'ustekinumab, anticorpo monoclonale il cui bersaglio terapeutico è rappresentato dalla proteina p40, subunità presente sia nell'IL-23 che nell'IL-12. Tale farmaco sarebbe quindi caratterizzato da una notevole selettività, in quanto è capace di inibire specificamente i linfociti di tipo Th1 e soprattutto Th17, che come illustreremo successivamente, presentano un ruolo rilevante nella patogenesi della malattia.

Negli ultimi anni, inoltre, accanto al ruolo di primo piano svolto dai linfociti T e quindi dall'immunità adattativa, numerosi studi hanno documentato un coinvolgimento sempre più rilevante dell'**immunità innata** nella patogenesi della psoriasi. Nelle pagine seguenti verranno analizzate sinteticamente le varie componenti immunologiche che prendono parte allo sviluppo delle lesioni cutanee in corso di psoriasi.¹⁴

Come è noto, l'immunità innata fornisce una rapida risposta difensiva nei confronti di agenti esogeni che vengono riconosciuti attraverso recettori non specifici. Recentemente, alterazioni dei meccanismi alla base dell'immunità innata sono stati evidenziati in numerose malattie cutanee immunomediate, tra cui la psoriasi.

Varie evidenze suggeriscono un ruolo particolarmente significativo dell'IFN- α (citochina correlata con l'immunità innata) nello scatenamento della psoriasi.¹³ In particolare, da molto tempo è noto che la terapia con IFN- α è in grado di scatenare in soggetti geneticamente predisposti una PV. In accordo con questa interpretazione, le cellule dendritiche plasmocitoidi (CDp), che rappresentano la principale fonte di IFN- α , risultano aumentate in modo significativo nelle lesioni psoriasiche. Le CDp esprimono il TLR-9, recettore che si lega a complessi formati dalla catelicidina (LL37, peptide antimicrobico prodotto dai cheratinociti) associata a frammenti di DNA self (anch'essi derivanti dai cheratinociti andati incontro a morte cellulare a seguito di eventi stressanti), determinandone l'attivazione e quindi la produzione di IFN- α . Le CDp possono essere attivate anche dai complessi catelicidina-RNA self, sempre di origine cheratinocitaria, capaci di legarsi ai TLR7 e 8. Al riguardo, risulta molto interessante l'evidenza sperimentale che l'imiquimod, farmaco in grado di attivare i TLR-7 e -8, è in

grado di indurre manifestazioni cutanee psoriasiformi dopo applicazione topica su modelli murini.

Nelle lesioni cutanee della psoriasi sono aumentate anche le cellule dendritiche mieloidi (CDm), che esprimono il CD11c.¹⁵ Tali cellule, una volta attivate a seguito dell'interazione con complessi catelicidina-RNA self oppure con l'IFN- α prodotto dalle pDC, vanno incontro a maturazione e sono in grado di produrre grandi quantità di citochine proinfiammatorie, tra cui IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α , la cui secrezione favorisce anche l'attivazione di una risposta immunitaria di tipo acquisito. Anche i cheratinociti svolgono un ruolo di primo piano nella patogenesi della malattia in quanto sono capaci di attivare l'immunità innata dando così avvio alla risposta infiammatoria in grado di generare la lesione psoriasica. Innanzitutto i cheratinociti sono capaci di liberare numerosi peptidi antimicrobici tra cui, oltre alla già citata catelicidina, vanno ricordate le β -defensine e la psoriasina (S100A7). Tali peptidi, accanto all'attività antimicrobica, presentano una funzione chemotattica e pro-infiammatoria, stimolando numerosi tipi di cellule immunitarie tra cui le cellule dendritiche e i linfociti T. I cheratinociti hanno inoltre un ruolo coadiuvante nelle reazioni infiammatorie cutanee, in quanto sono in grado di attivarsi a seguito dell'interazione con varie citochine prodotte dalle cellule dendritiche e dai linfociti T, e sono in grado a loro volta di produrre citochine e chemochine coinvolte nella patogenesi della psoriasi, tra cui IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α . Altri tipi cellulari facenti parte dell'immunità innata sembrano svolgere un ruolo patogenetico rilevante nello sviluppo della psoriasi. Tra essi devono essere citati:

- i granulociti neutrofili (GN), il cui accumulo nella cute psoriasica è uno dei marker istopatologici più caratteristici della malattia, essi vengono richiamati

in sede lesionale grazie all'abbondante produzione di CXCL8. Il ruolo dei GN, ancora da definire, potrebbe essere rappresentato dal mantenimento del danno tissutale a carico dei cheratinociti con conseguente liberazione di antigeni epidermici e di molecole proinfiammatorie;

- le cellule NK e i linfociti T NK, caratterizzati dall'espressione di CD1d, CD94 e CD161, che sono in grado di secernere, a seguito dell'attivazione indotta dai cheratinociti, grandi quantità di citochine proinfiammatorie attivamente coinvolte nella patogenesi della psoriasi, tra cui l'IFN- γ ;¹⁶

- i macrofagi, ritenuti tra i maggiori produttori di TNF- α e capaci inoltre di secernere citochine quali IL-12 e IL-23, in grado di indirizzare la risposta immunitaria adattativa rispettivamente verso un pattern di tipo Th1 e Th17.

Accanto all'immunità innata, il cui ruolo è stato identificato solo recentemente, nella patogenesi della psoriasi opera in modo determinante anche **l'immunità adattativa**, che vede come attore principale il linfocita T.

Fino agli anni '90, la psoriasi era ritenuta un disordine della proliferazione e della differenziazione cheratinocitaria. Successivamente è stato chiarito che l'iperplasia epidermica caratteristica della psoriasi era in realtà una conseguenza di alterazioni immunologiche determinate dall'attivazione dei linfociti T. Lo studio immunostochimico di lesioni psoriasiche recenti ed attive documenta che le cellule infiltranti il derma sono in prevalenza linfociti T maturi (CD3+) che appartengono alla sottoclasse CD4+ e mostrano segni di attivazione (DR+ CD25+). I linfociti T CD8+ sono dimostrabili in minore quantità e sono prevalentemente localizzati nell'epidermide. L'analisi delle caratteristiche immunologiche del TCR delle cellule CD4+ infiltranti la cute lesionale psoriasica

rivela una significativa espansione oligoclonale di $V\beta 2$, $V\beta 5-1$ e $V\beta 6$, da considerare l'espressione di una attivazione linfocitaria da superantigeni. Il reclutamento dei linfociti T a livello cutaneo avviene tramite specifiche molecole di adesione, tra cui vanno ricordati il CLA, l'integrina $\alpha 1\beta 1$ e il CD103 (o integrina $\alpha 4\beta 7$), iperespresse sui linfociti T localizzati nella cute psoriasica. Il blocco dell'interazione di tali molecole con i loro specifici substrati a livello cutaneo inibisce, in modelli animali di psoriasi, il reclutamento di linfociti T e quindi lo sviluppo delle lesioni psoriasiche. Fino a pochi anni fa, si riteneva che i linfociti coinvolti nella patogenesi della psoriasi fossero prevalentemente i **linfociti T polarizzati in senso Th1**, in quanto le citochine maggiormente espresse da cloni linfocitari T espansi a partire da cellule estratte da cute lesionale risultavano essere IFN- γ e IL-12. L'attività dei linfociti Th1 nella psoriasi era confermata dal fatto che tali citochine, e in particolare l'IFN- γ , fossero in grado di promuovere l'infiammazione cutanea grazie anche alla capacità di attivare i cheratinociti. Recentemente, tuttavia, è stato dimostrato che un'altra popolazione linfocitaria, i cosiddetti **linfociti Th17**, svolge un ruolo determinante nella patogenesi della malattia. Ciò è stato confermato, oltre che in studi immunopatologici a livello delle lesioni cutanee o del sangue di pazienti psoriasici, anche da recenti studi clinici che hanno dimostrato una notevole efficacia nella terapia della psoriasi da parte dell'anticorpo monoclonale ustekinumab, che è in grado di legarsi alla proteina p40 (subunità presente sia nell'IL-12 che nell'IL-23). L'IL-23, come preciseremo, è capace di orientare la polarizzazione dei linfociti T CD4+ in senso Th17.¹⁷

I linfociti Th17 sono caratterizzati dalla capacità di produrre IL-17 e altre citochine ad essa correlate (tra cui IL-21, IL-22 e IL-26). Numerosi studi hanno

precisato che le cellule T CD4⁺ secernenti IL-17 rappresentano una linea cellulare distinta, il cui sviluppo, a partire da precursori indifferenziati, è guidato da citochine e fattori di trascrizione specifici, tra cui sembrano essenziali, nell'uomo, l'IL-23 e, in minor misura, IL-1 β , IL-6 e IL-21, mentre più discusso nel promuovere la differenziazione in senso Th17 è il ruolo del TGF- β (fondamentale invece per lo sviluppo dei linfociti Th17 nel topo). Sia a livello lesionale che a livello sierico dei pazienti psoriasici, è stata ripetutamente documentata un'aumentata espressione di IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23.^{18,19} Inoltre, i linfociti Th17 sono stati riscontrati in percentuali maggiori rispetto ai soggetti sani di controllo sia in circolo che a livello cutaneo.

Il ruolo dei linfociti Th17 nella patogenesi della psoriasi sarebbe duplice: da una parte essi sarebbero in grado di indurre una iperplasia cheratinocitaria; dall'altro lato, favorirebbero l'induzione e il mantenimento della flogosi cutanea, grazie anche al richiamo di cellule proinfiammatorie a livello lesionale. L'IL-17, infatti, stimola la secrezione di chemochine in grado di attrarre i granulociti neutrofili, tra cui CXCL8, CXCL1 e CXCL5; inoltre, induce la secrezione da parte dei fibroblasti di IL-6, di cui è stata precedentemente ricordata la capacità di indurre il differenziamento dei linfociti T verso un pattern di tipo Th17.

Accanto all'IL-17, la citochina IL-22 sembra fondamentale per la patogenesi della lesione psoriasica, in quanto in grado di favorire la proliferazione dei cheratinociti, di alterarne i processi di differenziazione e di stimolare la produzione di peptidi antimicrobici cheratinocitari. A sottolineare l'importanza di tale molecola, molto recentemente è stata identificata una popolazione linfocitaria, quella dei cosiddetti **linfociti Th22**, in grado di produrre IL-22 ma non IL-17 e quindi da considerarsi distinta da quella dei linfociti Th17 stessi. I

linfociti Th22 presentano un homing preferenziale a livello cutaneo e, più in particolare, a livello epidermico; oltre a stimolare l'attivazione cheratinocitaria mediante l'IL-22, sono in grado di promuovere le risposte immunitarie (sia innate che adattative) mediante l'induzione della produzione, da parte degli stessi cheratinociti, di citochine quali l'IL-7 e l'IL-15. Queste citochine sono a loro volta in grado di stimolare i linfociti T e le cellule NK. Significative sono anche le ricerche che hanno dimostrato che il TNF- α , citochina di cui è ben nota l'attività nella psoriasi, sia in grado di stimolare la produzione di IL-22 e di favorire la differenziazione dei linfociti T naive in Th17 e Th22.²⁰

L'analisi molecolare del TCR, eseguita su linfociti estratti dalle lesioni psoriasiche, permette di dimostrare che la risposta linfocitaria T nella psoriasi è antigene-dipendente. Infatti, sembra essere presente un'elevata restrizione del TCR con riarrangiamenti altamente ripetitivi, indice di un'amplificazione dei linfociti T di tipo clonale. Inoltre, i riarrangiamenti del TCR sembrano essere stabili nel tempo all'interno dello stesso paziente e non è dimostrabile il fenomeno dell'*epitope spreading*. Tali riarrangiamenti sembrano essere sovrapponibili anche in pazienti differenti, suggerendo la presenza nella psoriasi di un antigene comune, che rappresenterebbe il bersaglio specifico della risposta immunologica. In base al mimetismo molecolare con antigeni dello *Streptococcus pyogenes*, il principale agente infettivo scatenante la psoriasi, sono stati individuati vari autoantigeni potenzialmente coinvolti nello scatenamento della psoriasi, tra cui la cheratina 6, la cheratina 17, l'ezrina, la maspina, la perossiredoxina 2 e la heat shock protein 27. Tuttavia, non esistono ancora dati conclusivi sulla natura dell'autoantigene(i) coinvolti nella patogenesi della psoriasi.²¹

Accanto ai linfociti T helper, caratterizzati dall'espressione di CD4, come rilevato in precedenza, nella psoriasi sono presenti anche linfociti T CD8+ o citotossici, sul cui ruolo nella patogenesi della malattia e come possibile bersaglio terapeutico è stata posta notevole attenzione negli ultimi anni. Analogamente ai linfociti CD4+, tali cellule possono essere classificate in varie sottopopolazioni in base allo specifico pattern di produzione citochinica. In particolare, i linfociti CD8+ presenti nell'epidermide psoriasica sono in grado di produrre IL-17; per questo motivo, sono stati definiti linfociti Tc17. Tali cellule sarebbero in grado di determinare l'attivazione dei cheratinociti mediante la produzione in loco di citochine tra cui le più importanti sarebbero le stesse sintetizzate dai linfociti Th17, ovvero la IL-17 e la IL-22. A confermare il possibile ruolo dei linfociti CD8+ nella patogenesi della psoriasi, occorre sottolineare che la loro attivazione avviene grazie all'interazione con molecole dell'MHC di I classe e che, come è stato riportato in precedenza, l'aplotipo HLA-Cw6 dell'MHC di I classe appare associato con maggiore frequenza alla psoriasi.²²

Negli ultimi anni è stata studiata in modo approfondito un'altra popolazione di linfociti T, quella dei **linfociti T regolatori (Treg)**. I linfociti Treg sono caratterizzati dalla capacità di sopprimere l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T effettori, svolgendo quindi un ruolo fondamentale nella regolazione delle risposte immunitarie, oltre che nella tolleranza verso gli antigeni self. Esistono vari sottotipi di linfociti Treg, classificati in base alla presenza di specifici marcatori, alla capacità di secernere vari tipi di citochine regolatorie e, soprattutto, alla modalità con cui si sviluppano. In base a questi elementi, possono essere distinti i linfociti Treg naturali, che originano dal timo, e i linfociti Treg adattativi, che originano in periferia a partire da linfociti T naïve e possono essere

distinti in linfociti T reg di tipo 1 (Tr1), caratterizzati dall'espressione di IL-10, e in linfociti Th3, caratterizzati dall'espressione di TGF- β . Il sottogruppo che fino ad oggi è stato più ampiamente studiato in patologia è rappresentato dai linfociti Treg naturali, che sono caratterizzati dal punto di vista molecolare dall'espressione di CD4, CD25 e, soprattutto, di FOXP3, ritenuto ad oggi il marcatore maggiormente specifico dei linfociti Treg. Alterazioni numeriche o funzionali a carico di tali cellule sembrano essere alla base della perdita della tolleranza e quindi della patogenesi di numerose malattie autoimmunitarie. Pur essendo necessari ulteriori studi, nella psoriasi sembrano essere presenti delle alterazioni a carico dei linfociti Treg naturali. In particolare, se dal punto di vista numerico non sembrano esserci deficit degni di rilievo sia a livello del sangue periferico che delle lesioni cutanee, i linfociti Treg naturali, documentati nei pazienti con psoriasi, presentano delle alterazioni funzionali che ne impedirebbero l'azione immunosoppressiva, facilitando quindi l'attivazione linfocitaria e lo scatenamento della flogosi a livello lesionale.²³

Come sottolineato in precedenza, i **cheratinociti** svolgono un ruolo di primo piano nella psoriasi, in quanto possono essere considerati una delle componenti principali della risposta immunologica innata.²⁴ Le loro alterazioni più significative possono essere schematizzate come segue.

- Alterazioni della proliferazione: i cheratinociti presenti nella cute psoriasica presentano un notevole accorciamento del ciclo cellulare ed un corrispondente aumento delle mitosi e dell'indice di proliferazione; allo stesso modo, il tempo di transito epidermico dei cheratinociti risulta ridotto da 45 a 37 ore. Tali alterazioni nel complesso determinano un notevole aumento giornaliero

della produzione di cellule epidermiche con la conseguente comparsa di un'iperplasia epidermica tipica della malattia.

- Alterazioni ultrastrutturali e molecolari: all'aumentata proliferazione dei cheratinociti, nella psoriasi si associa anche una loro modificazione ultrastrutturale, che comprende tra l'altro la riduzione dei tonofilamenti e la diminuzione del numero dei desmosomi, e alterazioni a carico di alcune molecole che rappresentano dei marker di differenziazione. Al riguardo è da sottolineare l'aumento delle citocheratine 6 e 16, espressione di proliferazione e la concomitante riduzione di altre citocheratine, espressione di differenziazione cheratinocitaria.

- Alterazioni dell'apoptosi: nella cute psoriasica, si assiste ad una riduzione della fisiologica apoptosi normalmente riscontrabile a livello epidermico; inoltre, i cheratinociti psoriasici sembrano essere maggiormente resistenti ai agli stimoli proapoptotici. Tali alterazioni, associate all'aumento del loro indice di proliferazione, sarebbero in grado di favorire la comparsa dell'iperplasia a livello dell'epidermide psoriasica.

- Alterazioni biochimiche: i cheratinociti psoriasici presentano numerose alterazioni biochimiche, tra cui vanno sottolineate le alterazioni a carico dei segnali di trasduzione di membrana, in particolare del recettore per l'*epidermal growth factor* e del sistema dei nucleotidi ciclici, con conseguente stimolo alla proliferazione.

Accanto alle alterazioni immunologiche e alle disfunzioni cheratinocitarie, il terzo fattore che entra in gioco nello sviluppo delle lesioni psoriasiche è rappresentato dalla **neoangiogenesi**.²⁵ Una delle caratteristiche istopatologiche più tipiche della

psoriasi è infatti la presenza di un aumento del numero, di una dilatazione e di una modificazione morfologica dei capillari a livello delle papille dermiche, alterazioni che si svilupperebbero addirittura più precocemente dell'iperplasia epidermica. A livello cellulare, si riscontra un aumento della proliferazione delle cellule endoteliali dell'ansa capillare venosa con conseguente venulizzazione dell'ansa intrapapillare, mentre a livello ultrastrutturale si rileva la formazione di una membrana basale pluristratificata e fenestrazioni endoteliali con lacune (*gaps*) tra endotelioцити. Queste alterazioni contribuiscono a stimolare l'iperplasia epidermica aumentando il flusso ematico nella cute psoriasica di circa due volte rispetto alla cute normale. Le modificazioni del microcircolo nella psoriasi sono determinate dalla aumentata produzione di numerosi mediatori, tra cui i più importanti sono rappresentati dal *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), dal TNF- α , dall'IL-8 e dall'IL-17. Tali fattori determinerebbero anche un'aumentata espressione da parte degli endotelioцити di varie molecole di adesione necessarie per il reclutamento a livello lesionale delle cellule infiammatorie che si riscontrano nella cute psoriasica.

Nelle pagine precedenti è stato sottolineato come vari fattori siano responsabili dello **sviluppo delle lesioni cutanee** in corso di psoriasi. Tuttavia, esistono ancora dei punti da chiarire nella patogenesi della malattia, a cominciare da quali siano i fattori che determinino l'avvio delle alterazioni immunologiche documentate nella cute psoriasica. Innanzitutto, nonostante numerose evidenze suggeriscano una patogenesi di tipo autoimmunitario mediata dai linfociti T, non sono ancora stati evidenziati con certezza gli antigeni (self o non self) verso i quali, in soggetti geneticamente predisposti, sarebbe indirizzata la risposta immunologica. Ricerche recenti sottolineano il ruolo svolto nella psoriasi guttata da superantigeni di

origine batterica in grado di determinare l'attivazione linfocitaria T. Anche se il ruolo di questi antigeni non può essere generalizzato a tutte le forme di psoriasi, sembra sicuro l'intervento, nelle fasi precoci della malattia, dell'immunità innata: in particolare di specifici peptidi antimicrobici come la catelicidina, liberati da cheratinociti geneticamente alterati e probabilmente attivati da vari stimoli. Questi peptidi si legherebbero a molecole di DNA o RNA self, anch'esse di presumibile origine cheratinocitaria, dando luogo a complessi molecolari che rappresenterebbero quindi potenziali autoantigeni in grado di scatenare l'autoimmunità. Successivamente i complessi peptidi antimicrobici-DNA self sarebbero in grado di attivare le cellule dendritiche e, conseguentemente, di dare l'avvio alla risposta immunitaria adattativa mediata da linfociti Th1 e, soprattutto, Th17 e Th22. Le già descritte alterazioni genetiche di tipo "iperattivante" a carico dei loci codificanti per le citochine associate all'IL-23 e per l'NF- κ B, associato all'ipoespressione dei geni dell'IL-4 e dell'IL-13, favorirebbero ulteriormente la polarizzazione della risposta in senso Th1 e Th17. L'attivazione di questi specifici subset di linfociti T e la conseguente espansione clonale condizionerebbe anche la generalizzazione dello stato di sensibilizzazione agli specifici antigeni a tutto l'organismo. Le fasi successive sarebbero correlate alla produzione di citochine (come IFN- γ , IL-17, IL-22 e numerose altre) capaci: 1) di promuovere e automantenere la risposta infiammatoria a livello dermico; 2) di favorire la neoangiogenesi e l'attivazione degli endotelociti, con conseguente reclutamento di cellule infiammatorie; 3) di indurre la proliferazione cheratinocitaria, favorita anche da alterazioni predisponenti dei cheratinociti tra cui la aumentata resistenza all'apoptosi, con conseguente iperplasia dell'epidermide.

Tutte queste alterazioni immunologiche, da cui poi deriverebbero le alterazioni istopatologiche caratteristiche della lesione psoriasica, sarebbero favorite da un insufficiente meccanismo di controllo secondario a dei difetti funzionali a carico dei linfociti Treg.

1.6 Diagnosi e diagnostica differenziale

La diagnosi di psoriasi volgare è abitualmente abbastanza facile per la tipica presentazione clinica, per la positività della semeiotica cutanea, per la localizzazione topografica degli elementi eritemato-squamosi. Tuttavia alcune difficoltà diagnostiche possono porsi per le localizzazioni particolari: può risultare difficile, infatti, differenziare una sebopsoriasi dalla dermatite seborroica, la psoriasi palmo-plantare dall'eczema ipercheratosico, la psoriasi inversa dall'intertrigine da candida e dalla tinea cruris, la PV cronica stazionaria in regione sacrale dal lichen simplex. L'esame clinico accurato, i reperti istologici, la videocapillaroscopia, che dimostra su cute lesionale capillari tortuosi con aspetto a gomitolino, ed alcuni esami di laboratorio (per es. l'esame micologico microscopico e colturale) sono quasi sempre dirimenti. Appare invece particolarmente ardua la diagnosi della psoriasi minima e atipica, che facilmente può essere interpretata come una dermatite atopica, un eczema da contatto, una dermatite seborroica, una micosi. In questi casi la paziente e meticolosa ricerca di lesioni, anche modeste in sedi tipiche, e l'interessamento ungueale possono consentire di porre il sospetto diagnostico, che l'esame istopatologico potrà successivamente chiarire. Per le "forme speciali" di psoriasi, la diagnostica differenziale si pone nella varietà eritrodermica con le altre forme di eritrodermia

(post eczematosa, post dermatite atopica, post dermatite seborroica, da farmaci), con i linfomi (sindrome di Sezary), con il pemfigo foliaceo e la pitiriasi rubra pilare. Le forme di psoriasi pustolosa circoscritta pongono problemi di diagnosi differenziale soprattutto con le epidermomicosi e le dermatiti eczematose microbiche e/o disidrosiche, mentre le forme pustolose generalizzate devono essere differenziate dalle altre dermatosi neutrofiliche e in special modo con la sindrome di Sneddon e Wilkinson, che presenta pustole flaccide con accumulo di pus in sede declive (= ipopion) su fondo eritematoso a disposizione figurata. La psoriasi artropatica infine pone problemi di diagnosi differenziale con la spondilite anchilosante (per le localizzazioni ileo-sacrali) e con l'artrite reumatoide.

Attualmente non esiste un metodo capace di raccogliere tutte le possibili "misure" di gravità della malattia psoriasica, intesa non soltanto in termini di patologia cutanea, ma anche di qualità della vita, impatto psicologico e sociale, disabilità, comorbidità associate, presenza di lesioni ungueali, etc. Pur riconoscendone numerosi limiti, la modalità più frequentemente usata per valutare la gravità della malattia è lo *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI). La formula per il calcolo del PASI è la seguente:

$$0,1 (Eh + Ih + Dh) Ah + 0,2 (Eu + Iu + Du) Au + 0,3 (Et + It + Dt) At + 0,4 (El + Il + Dl) Al$$

h: testa; u: arti superiori; t: tronco; l: arti inferiori; A: area affetta;

Punteggio (0-6) 0 = nessun interessamento; 1 = <10%; 2 = 10 <30%; 3 = 30 <50%; 4 = 50 <70%; 6 = 90-100%.

E: eritema; I: infiltrazione; D: desquamazione.

Punteggio (0-4) 0 = assente; 1 = lieve; 2 = moderato; 3 = marcato, 4 = molto marcato.

Un altro metodo per misurare la gravità della psoriasi frequentemente usato è la *Body Surface Area* (BSA), un indice basato sulla determinazione della percentuale di superficie corporea affetta dalla malattia.

Infine i criteri internazionali adottati per la valutazione della gravità della psoriasi sono presenti nella **Tabella III**.

Tabella III. Criteri per la valutazione della gravità della psoriasi volgare.

Gravità della psoriasi	Criteri dell'Efficacy Working Party European Medicines Agency, modificati
In remissione o minima	Assenza stabile di lesioni. Segni minori/borderline (pitting ungueale, desquamazione cuoio capelluto). Poche chiazze isolate ignorate dal paziente.
Lieve	BSA <10%, PASI <10; buon controllo da parte della terapia topica.
Moderata	BSA >10%, PASI 10-20; ricorso a terapia sistemica possibile e non problematico.
Moderata-severa	BSA >10%, PASI 10-20; mancata risposta a terapia topica oppure BSA <10% ma lesioni in aree "problematiche" (viso, superfici palmo-plantari).
Severa	BSA >20%, PASI >20 o BSA <20%, ma importanti manifestazioni locali o instabile o rapidamente progressiva. PsA invalidante.
Severa a prognosi riservata	Psoriasi pustolosa generalizzata; eritrodermia psoriasica; associazione con sintomi sistemici e possibile "skin failure".

Per valutare l'impatto sulla qualità della vita si utilizzano "strumenti specifici" come il *Dermatology Life Quality Index* (DLQI). In base alla regola del "dieci", è stato proposto che valori superiori a 10 di PASI, BSA o DLQI possono permettere di identificare una psoriasi severa.

Il gruppo GRAPPA (*Group for Research and Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis*), ha proposto una classificazione in vari gradi di gravità anche per la psoriasi artropatica (PsA) (**Tabella IV**).

Tabella IV. Criteri di gravità della PsA secondo il gruppo GRAPPA.

PsA	Lieve	Moderata	Severa
Periferica	<5 articolazioni; no danno radiografico; no perdita di funzionalità articolare; minimo impatto su QoL; gravità lieve secondo il paziente.	≥5 articolazioni; danno radiografico, inadeguata risposta terapeutica; moderata perdita di funzionalità articolare; moderato impatto su QoL; gravità moderata secondo il paziente.	≥5 articolazioni; danno radiografico severo; inadeguata risposta terapeutica; grave perdita di funzionalità articolare; notevole impatto su QoL; gravità marcata secondo il paziente.
Assiale	Dolore lieve; funzionalità articolare conservata.	Perdita di funzionalità o BASDAI >4.	Fallimento terapeutico.
Entesite	1-2 distretti interessati; funzionalità conservata.	>2 distretti interessati o perdita di funzionalità.	>2 distretti interessati o perdita di funzionalità e fallimento terapeutico.
Dattilite	Dolore assente o lieve; funzionalità normale.	Erosioni o perdita di funzionalità.	Fallimento terapeutico.
BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BSA: superficie cutanea affetta; PASI: Psoriasis Area and Severity Index; QoL: qualità della vita.			

Capitolo 2

I linfociti Th17

2.1 Introduzione

I linfociti T helper CD4⁺ (Th) sono cellule fondamentali nella regolazione delle risposte immunitarie. Vari tipi di cellule Th originano a partire dalle cellule T indifferenziate (in seguito alla loro attivazione da parte delle cellule presentanti l'antigene e sotto l'influenza di diversi segnali) e si specializzano nella produzione di specifiche citochine. Nel 1986 per la prima volta sono state individuate da Coffman e Mosmann due linee cellulari distinte: le cellule T helper tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2).^{26,27}

Le cellule Th1 regolano l'immunità cellulare attraverso la produzione di interferone γ (INF- γ) e l'attivazione di macrofagi, mediano la difesa verso patogeni intracellulari (come *Mycobacterium tuberculosis*) e sono responsabili delle risposte di ipersensibilità ritardata (come l'intradermoreazione di Mantoux e le reazioni da contatto indotte da apteni).

Le cellule Th2, invece, mediano l'immunità umorale e intervengono nelle reazioni IgE da ipersensibilità e, attraverso la produzione di IL-4, IL-9 e IL-13, contribuiscono alla protezione nei confronti di parassiti extracellulari (come gli elminti).^{28,29}

L'esatto meccanismo che porta alla polarizzazione della cellula Th naive in senso Th1 o Th2 non è stato completamente chiarito. E' presumibile che una precoce produzione di IFN- γ , IFN- α o IL-12 da parte delle cellule dell'immunità innata, induca la differenziazione delle cellule in senso Th1 attraverso l'attivazione di Signaling Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) o di STAT4 capaci di attivare T-bet, responsabile dell'espressione di geni specifici Th1.

Come è noto, le proteine STAT sono proteine a localizzazione citoplasmatica, coinvolte nell'importante via di trasduzione del segnale Jak/STAT. In risposta a diversi stimoli citochinici, le molecole enzimatiche Jak (Janus Kinase) fosforilano le molecole STAT, permettendone la dimerizzazione e il loro trasporto nel nucleo, dove funzionano da fattori di trascrizione attraverso il legame a specifiche regioni promoter del DNA.³⁰

Per la differenziazione delle cellule in senso Th2 sarebbe invece necessaria una precoce produzione di IL-4 (in assenza di IL-12), che induce l'attivazione di STAT6 e promuove l'espressione di GATA-binding protein 3 (GATA3), essenziale sia per la differenziazione TH2 che per la produzione di IL-4.^{28,29} Le cellule Natural Killer sono responsabili della produzione di IFN- γ , le cellule dendritiche plasmocitoidi sono la maggiore fonte di IFN- α , mentre le cellule dendritiche mieloidi sono le responsabili della produzione di IL-12 ovvero della più potente citochina capace di indurre il processo di polarizzazione in senso Th1.³¹

In condizioni normali queste due popolazioni linfocitarie (Th1 e Th2) sono in equilibrio tra loro, modulandosi negativamente a vicenda: l'IL-4 è infatti capace di inibire l' IFN- γ e viceversa³² mentre, T-bet interagisce, inibendo GATA3.³³

E' stata individuata anche una terza popolazione di cellule T helper, capace di produrre sia citochine Th1 che Th2, chiamati linfociti T helper tipo 0 (Th0).³⁴ In questo ambito, negli ultimi anni si è inserita una nuova famiglia di cellule T CD4⁺ helper, caratterizzate dalla capacità di produrre IL-17 e per questo chiamate linfociti T helper tipo 17 (Th17).^{35,36} Numerosi studi concordano nell'affermare che le cellule T CD4⁺ secernenti IL-17 rappresentino una linea cellulare distinta, il cui sviluppo, a partire da precursori indifferenziati è guidato da citochine e fattori di trascrizione specifici. E' stato dimostrato infatti che la differenziazione e la sopravvivenza di tali cellule sono regolate in modo totalmente indipendente dalle linee di cellule T helper precedentemente descritte.^{35,36} In vitro, la differenziazione di cellule CD4⁺ in cellule produttrici di IL-17 avviene efficacemente solo in assenza di citochine Th1 e Th2, in quanto, citochine e fattori di trascrizione specifici delle due classi principali di T helper regolano negativamente l'espressione di IL-17. Inoltre, cellule già differenziate in senso Th17 sono insensibili agli effetti inibitori delle citochine Th1 e Th2.^{35,36} Da questi dati e' possibile ipotizzare che, in condizioni normali, esista nell'organismo un fine meccanismo costituito da citochine coinvolte nella differenziazione delle linee Th1 e Th2 che controlla, reprimendole, le cellule Th17. Non è ancora chiaro se i linfociti Th17 possano a loro volta inibire lo sviluppo delle altre popolazioni T helper. E' stato tuttavia osservato che in vitro, l'IL-23 o l'IL-17 stessa possono sopprimere la differenziazione cellulare in senso Th1 pur in presenza di IL-12.³⁷

E' stato ipotizzato che i linfociti Th1 fossero coinvolti nella genesi delle malattie autoimmuni organo-specifiche.³⁶ Tuttavia in seguito a studi effettuati su modelli murini è stato dimostrato che la presenza di un difetto dell' IFN- γ , del recettore dell'IFN- γ (IFN- γ R) o di IL-12 non annulla, anzi, in alcuni casi favorisce,

l'instaurarsi e la gravità di processi morbosi autoimmuni. Inoltre, topi privi di IFN- γ , di IFN- γ R o STAT1 sono particolarmente suscettibili all'encefalite sperimentale autoimmune e allo sviluppo di uveite autoimmune.^{38,39} Tutto ciò suggerisce l'esistenza di un'altra linea cellulare distinta dalle altre coinvolta nella genesi dell'autoimmunità.

I linfociti Th17 sono stati ritrovati sia nei topi che nell'uomo, ma le caratteristiche fenotipiche, funzionali e il meccanismo responsabile del loro sviluppo appaiono diverse nelle due specie.

2.2 I linfociti Th17 nel topo

Numerosi studi sono stati condotti su modelli animali murini. Nel 2006, tre gruppi di ricerca indipendenti hanno dimostrato che nel topo, i principali responsabili della differenziazione dei linfociti Th17, a partire da cellule T naive, sono il Transforming Growth Factor β (TGF- β) e l'IL-6.⁴⁰⁻⁴²

La completa differenziazione Th17 richiede l'espressione del retinoic acid-related orphan receptor- γ t (ROR γ t) e ROR α , entrambi dipendenti da STAT3 e attivati preferenzialmente dall'IL-6, IL-21 e IL-23. Tuttavia l'IL-6 da sola non è in grado di attivare ROR γ t. Invece il TGF- β risulta assolutamente necessario, sia per indurre il processo di produzione di IL-17 nelle cellule T naive sia per indurre l'espressione di IL-23R, consentendo alle cellule in via di differenziazione di rispondere allo stimolo indotto da IL-23 che ne promuove la loro maturazione.⁴³

Il TGF- β promuove lo sviluppo delle cellule Th17 e, inibendo T-bet e GATA3, sopprime la generazione di cellule Th1 e Th2.⁴⁴ In tal modo il TGF- β gioca un ruolo determinante nella patogenesi delle malattie autoimmuni. Inoltre, TGF- β , in

assenza di IL-6 ma in presenza di IL-2, aumenta l'espressione del fattore di trascrizione FOXP3 nelle cellule CD4⁺ CD25⁺, trasformandole in linfociti Treg inducibili, che sopprimono la risposta immunitaria. Attraverso questo meccanismo il TGF- β stimola la tolleranza immunologica. Inoltre, per completezza, si ricorda che il TGF- β , induce la produzione di IgA a livello della mucosa intestinale.⁴⁵

Anche l'IL-6 possiede una doppia funzione: promuove lo sviluppo della risposta Th17, attraverso STAT3 e contemporaneamente è in grado di inibire l'induzione TGF- β -dipendente di linfociti Treg FoxP3⁺. Il suo ruolo pro-infiammatorio è confermato dal fatto che il trattamento dell'encefalite sperimentale autoimmune (modello sperimentale murino della sclerosi multipla) con anticorpi anti-IL-6 migliora la sintomatologia neurologica e topi privi di IL-6 sono resistenti a tale patologia.⁴⁵

Da queste ricerche risulta quindi probabile che lo stesso precursore cellulare indifferenziato possa diventare cellula regolatoria della risposta immunitaria Treg FoxP3⁺ o Th17 proinfiammatoria, con ruoli quindi totalmente opposti, a seconda dell'ambiente citochinico in cui si trova.⁴⁴

Anche le molecole costimolatorie necessarie per il processo di differenziamento sono diverse da quelle richieste per le linee Th1 e Th2: cellule T CD4⁺ isolate da topi privi di fattori di trascrizione propri delle linee Th1 e Th2 mantengono la capacità di differenziarsi in vitro in cellule Th17. Ciò significa che nessuno di questi fattori di trascrizione è necessario per questo processo di differenziazione e che sono in causa fattori distinti. Finora è stato individuato un solo fattore specifico, ovvero il già citato ROR γ . Si tratta di un recettore nucleare espresso solo nelle cellule ematopoietiche, in particolare dalle cellule linfocitarie fetali che

partecipano alla formazione dei linfonodi e delle placche di Peyer, delle cellule linfocitarie intestinali e dei timociti; questo fattore nucleare è anche espresso dalle cellule Th17 e dalle cellule produttrici IL-17 presenti nella lamina propria intestinale. Numerosi dati sperimentali fanno supporre che contribuisca (in concerto con altri fattori) alla differenziazione di queste cellule nel topo, ma sono necessarie ulteriori ricerche per precisarne l'attività funzionale.⁴⁶

2.3 I linfociti Th17 nell'uomo

Lo sviluppo della linea Th17 nell'uomo non corrisponde esattamente a quella del topo. Nel 2007 diversi studi dimostrarono che il TGF- β non induceva la differenziazione in senso Th17, ma anzi, la bloccava, così come era capace di inibire la produzione di IL-17 da parte di linfociti T.⁴⁷⁻⁴⁹ Fu proposto invece che la combinazione di IL-1 β e IL-6 o IL-1 β e IL-23 potesse promuovere la differenziazione Th17 nelle cellule umane. L'anno successivo tre nuove ricerche provarono indipendentemente che TGF- β è al contrario un fattore essenziale per la differenziazione delle cellule Th17 umane. TGF- β sarebbe necessario per l'espressione di RORC2 (equivalente a ROR γ t murino), ma in presenza di un eccesso di TGF- β la sua espressione e la sua funzione sono inibite. RORC, in questo caso, può essere disinibito solo in presenza di IL-6, IL-23 o IL-21.⁵⁰⁻² Studi ancora più recenti ipotizzano che i linfociti Th17 possano originare da precursori T CD161⁺CD4⁺, cellule che esprimono costituzionalmente sia RORC2 sia IL-23R, suggerendo che l'espressione di RORC2 non dipenda da TGF- β . Di conseguenza TGF- β non avrebbe di fatto un ruolo nella differenziazione dei linfociti Th17, ma potrebbe agire indirettamente inibendo l'attività delle cellule

producenti IFN- γ . Quest'ultimo, insieme a IL-4, IL-12, IL-27, sopprime la differenziazione, così come l'espressione di citochine Th17.⁵³

Anche il ruolo di IL-2 è diverso tra uomo e animale: nell'uomo infatti la mancata espressione di IL-2 inibisce completamente lo sviluppo di cellule Th17, così come quella delle cellule Th1 e Th0; ciò indica un suo probabile ruolo nella sopravvivenza delle cellule T.⁵² Per definire meglio le cellule Th17 umane sono state studiate con particolare attenzione le caratteristiche del fattore di trascrizione ROR γ t, dimostrando che nell'uomo l'espressione di tale fattore è ristretta alle cellule T della memoria producenti IL-17, in particolare alle cellule CCR6⁺ CCR4⁺.⁵⁰

2.4 Il ruolo dell'IL-23

L'IL-23 appartiene alla famiglia della IL-12, che è un importante regolatore della differenziazione in senso Th1 ed è composta dalle subunità p35 e p40. L'IL-23 è un eterodimero che contiene la stessa subunità p40 dell'IL-12 ma legata alla subunità p19. Anche i corrispondenti recettori hanno struttura simile: il recettore dell' IL-12 è composto da IL-12R β 1 e IL-12R β 2, mentre quello di IL-23 contiene IL-12R β 1 associato a IL-23R. In corso di flogosi, l'IL-23 è prodotta dalle cellule dendritiche attivate dall'antigene e dai macrofagi. Inizialmente si pensava che l'IL-23 fosse responsabile della differenziazione delle cellule Th17. L'ipotesi derivava dal fatto che l'espressione di IL-17 da parte dei linfociti T CD4⁺ è fortemente stimolata da IL-23 e che topi con deficit di p19, dopo immunizzazione, mostrano una normale risposta Th, ed invece una scarsa produzione di cellule producenti IL-17. Tuttavia il IL-23R non è espresso sulle cellule T indifferenziate, ma in una

sottopopolazione di cellule T CD4⁺ della memoria; quindi questa citochina, almeno in vitro, ha solo la funzione di promuovere la sopravvivenza e favorire l'espansione di cellule Th17 già differenziate. L'IL-23 è comunque necessaria per la funzione effettrice di queste cellule, infatti cellule Th17 già differenziate, solo in presenza di questa citochina mantengono il loro fenotipo di linfociti T produttori di IL-17; se ristimate invece con IL-2, diventano cellule Th1 e producono IFN- γ .

2.5 Il ruolo dell' IL-27⁵⁴

Come precedentemente accennato, l'IL-27, altro membro della famiglia dell'IL-12, regola negativamente lo sviluppo delle cellule Th17. E' una citochina eterodimerica, composta dalla proteina trascritta dal gene 3 indotto dal virus di Epstein Barr e dalla catena p28. L'IL-27 è legata anche all'IL-6: la subunità gp130 del recettore di IL-6 e la subunità WSX-1 formano il recettore dell'IL-27 (IL-27R) espresso su alcune cellule del sistema immunitario (come i linfociti T CD4⁺ o i linfociti T CD8⁺). L'IL-27 contribuisce alla polarizzazione in senso Th1, in quanto aumenta l'espressione di T-bet e della catena β 2 di IL-12R; allo stesso tempo riduce l'espressione di GATA3, specifico della risposta Th2. Studi recenti hanno dimostrato che l'IL-27 può anche limitare entrambe le risposte Th1 e Th2, coinvolte nella risposta a vari tipi di infezioni da parassiti. Infatti, topi carenti di IL-27R sviluppano un'esagerata risposta T helper durante la fase acuta di varie patologie indotte da vari protozoi come toxoplasmosi, morbo di Chagas, leishmaniosi, e infestazioni da elminti. Da sola è in grado di inibire la differenziazione Th17 innescata da IL-6 e TGF- β nel topo; quindi, pur essendo legate dalla condivisione di un componente recettoriale, IL-6 e IL-27 hanno effetti

opposti. Per il suo effetto soppressivo su queste cellule è richiesto STAT1, anche se ancora non è noto il meccanismo esatto.

2.6 Funzione dei linfociti Th17

I linfociti Th17 sono importanti produttori di IL-17A e IL-17F, ambedue sono interleuchine appartenenti alla famiglia dell'IL-17 che comprende anche IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-E (nota anche con il nome di IL-25). L'IL-17A e IL-17F agiscono su diversi tipi di cellule (come fibroblasti, cellule endoteliali, cellule epiteliali, cheratinociti e macrofagi); inducono la produzione di altre citochine (come IL-6, il granulocyte-macrophage CSF (G-CSF), granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), IL-1, transforming growth factor (TGF- β), tumor necrosis factor (TNF- α)), molte chemochine (come monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-2) e diverse prostaglandine (come PGE2). Attraverso questa attività le cellule Th17 hanno la capacità di stimolare e richiamare i granulociti neutrofili nel sito dell'infiammazione. Inoltre i linfociti Th17 sarebbero capaci di rilasciare anche altre citochine come IL-21, IL-22, e IFN- γ . Si tratta di molecole pleiotropiche, ma che sono coinvolte, a vario titolo nella perpetuazione del danno.

2.7 Ruolo dei linfociti Th17 nelle malattie autoimmuni

Utilizzando l'ibridazione in situ è stato possibile ritrovare un elevato numero di cellule esprimenti mRNA-IL17 nel fluido cerebrospinale e nel sangue periferico di soggetti con sclerosi multipla.⁵⁵ Inoltre è stato dimostrato che i linfociti Th17 umani sono capaci di mediare la distruzione della barriera ematoencefalica e

l'infiammazione del sistema nervoso centrale attraverso il reclutamento dei linfociti T CD4+.⁵⁶ Sia l'IL-17, sia IL-23p19 sono stati trovati nel siero e nel liquido sinoviale di molti pazienti con artrite reumatoide.^{57,58} L'IL-17 è stata ritrovata anche nel siero e nei tessuti dei soggetti con lupus eritematoso⁵⁹ o affetti da sclerosi sistemica.⁶⁰ Elevati livelli di IL-17 sono stati individuati anche nel siero e nei tessuti intestinali di pazienti affetti da malattia di Crohn,^{61,62} malattia celiaca e nella cute di pazienti affetti da patologie infiammatorie cutanee come dermatite indotta dal nichel, psoriasi e dermatite atopica.^{63,64} E' doveroso tuttavia effettuare alcune precisazioni. Innanzitutto non è ancora definito se il semplice ritrovamento di IL-17 nei liquidi biologici o nei tessuti di pazienti affetti da malattie autoimmunitarie possa di per sé avere significato patologico. Nel 2009 O'Connor e collaboratori hanno addirittura affermato che l'IL-17 avesse un ruolo protettivo. Studiando modelli animali sperimentali di colite, hanno dimostrato che l'infiammazione risultava meno severa nel topo le cui cellule T non potevano produrre l'IL-17 (confermandone il ruolo pro-infiammatorio), ma l'infiammazione risultava più grave nei topi in cui le cellule T erano deficitarie del recettore per l'IL-17 e quindi incapaci di rispondere allo stimolo (che suggerisce il ruolo apparentemente anti-infiammatorio dell'IL-17A).^{65,66}

Infine, si deve anche puntualizzare, che nella gran parte degli studi precedentemente citati, i risultati sono stati ottenuti dosando la presenza di mRNA dell'IL-17 nei tessuti e/o misurando la proteina nei liquidi biologici. Andando a studiare invece la presenza effettiva di cellule Th17 nei tessuti, i risultati cambiano nettamente. Nei pazienti con artrite reumatoide ad esempio i linfociti Th1 sono maggiormente rappresentati rispetto ai Th17.⁶⁵

2.8 Plasticità dei linfociti Th17

Sulla base degli studi pubblicati negli ultimi mesi è emersa l'ipotesi che i linfociti Th17 possano essere cellule dotate di elevata "plasticità", in grado cioè di trasformarsi in altri tipi cellulari in seguito all'ambiente citochinico in cui si trovano. È stata dimostrata ad esempio l'esistenza di una popolazione di linfociti Th17 umani che in presenza di IL-12 e IFN- γ riducono l'espressione di RORC, aumentano l'espressione di T-bet e diventano capaci di produrre IFN- γ , oltre all'IL-17A (linfociti Th17/Th1) oppure solo IFN- γ (linfociti Th1) ma non la sola IL-17.⁶⁷ Inoltre un piccolo numero di linfociti Th17 in presenza di IL-4 esprimono GATA3 e diventano capaci di produrre IL-4 (cellule Th17/Th2).⁶⁸ Wang e collaboratori hanno dimostrato inoltre che, stimolando con citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IL-6, IL-21) i classici linfociti Th2 murini, questi diventano capaci di produrre IL-17.⁶⁹ Il risultato tuttavia non è stato confermato da altri gruppi di ricerca. Resta ancora da definire il ruolo di queste popolazioni (Th17, Th17/Th1, Th1) nella patogenesi delle malattie autoimmuni con l'obiettivo di individuare nuove possibilità terapeutiche. A tal proposito è stato dimostrato che l'anticorpo monoclonale umano che inibisce il legame dei ligandi al recettore sia dell'IL-12 che dell'IL-23 riduce le alterazioni associate all'artrite psoriasica, confermando l'ipotesi che Th1 e Th17 cooperino nel processo infiammatorio.⁷⁰

Capitolo 3

Scopo della ricerca

La psoriasi è una comune dermatosi cronica che è stata per lungo tempo considerata dal punto di vista patogenetico come un disordine primario dei cheratinociti, nei quali una disfunzione della regolazione dell'omeostasi cellulare avrebbe determinato una proliferazione incontrollata associata ad un alterato processo di differenziazione cellulare. Successivamente, tuttavia, è stato dimostrato che il principale meccanismo patogenetico alla base dell'insorgenza della malattia è rappresentato in realtà da un'alterata risposta immunitaria mediata da linfociti T CD4⁺.⁷¹

Fino a pochi anni fa, il sottotipo di linfociti T prevalentemente coinvolto nella psoriasi era ritenuto essere quello dei linfociti Th1, capaci di produrre grandi quantità di citochine con dimostrata attività patogenetica nella psoriasi quali TNF- α e IL-2, a cui si associava una concomitante riduzione dell'espressione delle citochine appartenenti ad un pattern di tipo Th2, tra cui IL-4 e IL-13.^{72,73} Recentemente, come abbiamo rilevato in precedenza, numerose evidenze sperimentali hanno suggerito che una popolazione linfocitaria di recente acquisizione, quella dei linfociti Th17, possa svolgere un ruolo di primo piano non solo nella patogenesi di numerose malattie autoimmunitarie un tempo

attribuite ai Th1, ma anche in quella della psoriasi.^{15,17,74-77} In accordo con questa ipotesi, studi recenti hanno dimostrato un aumento dei linfociti IL-17-secerenti nella cute lesionale e nel sangue periferico di pazienti con psoriasi.^{20,78}

Altre popolazioni di linfociti T sembrano implicate nella malattia; tra esse, devono essere ricordati i linfociti T Treg. Alcuni studi hanno individuato nella psoriasi uno sbilanciamento tra i linfociti T effettori, tra cui i linfociti Th17, e i Treg, suggerendo l'ipotesi che una riduzione numerica o una alterazione funzionale dei Treg con conseguente ridotta capacità immunoregolatoria possa scatenare l'instaurarsi della risposta infiammatoria alla base della patogenesi della psoriasi.^{79,80} La totalità di questi studi, come ricordato in precedenza, ha focalizzato l'attenzione sui cosiddetti Treg naturali, che si sviluppano a livello timico e sono caratterizzati dall'espressione costitutiva di CD25 e FOXP3, mentre al momento non esistono in Letteratura ricerche che abbiano analizzato gli altri sottotipi di Treg, tra cui i cosiddetti linfociti Tr1, appartenenti a i Treg adattativi o inducibili, che si distinguono dai precedenti per la capacità di originare a livello periferico e di produrre grandi quantità della citochina regolatoria IL-10.⁸¹ Altri elementi rimangono da chiarire relativamente al ruolo dei linfociti T nella patogenesi della psoriasi. In particolare, le conoscenze relative alla correlazione delle varie popolazioni linfocitarie potenzialmente implicate nella malattia (Th1, Th2, Th17, Treg) con la gravità delle manifestazioni cliniche e con la risposta alle terapie, tra cui le moderne terapie biologiche basate sull'inibizione del TNF- α , sono ancora estremamente limitate.

Riguardo a quest'ultimo punto, nonostante l'efficacia degli inibitori del TNF- α sia ormai stata dimostrata da numerosi studi clinici, sono molto esigui i dati sulla loro eventuale capacità di interagire con i principali sottotipi di linfociti T

coinvolti nella patogenesi della psoriasi.^{18,19,82}

Per chiarire questi punti, nel presente studio sono stati valutati gli effetti di etanercept, un farmaco biologico capace di inibire il TNF- α , e di acitretina, farmaco appartenente al gruppo dei retinoidi che possiede una comprovata efficacia nel trattamento della psoriasi, su alcune sottopopolazioni di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ capaci di produrre citochine appartenenti ai pattern Th1, Th2, Tr1 e, in particolare, Th17. Tali indagini sono state condotte sia sulla cute lesionale (mediante metodica immunostochimica* e citofluorimetrica) che a livello del sangue circolante (esclusivamente con metodica citofluorimetrica) di pazienti affetti da psoriasi volgare. Inoltre, sono state analizzate a livello sierico mediante metodica immunoenzimatica* le principali citochine prodotte dal pattern Th17 prima e dopo la terapia. Per controllo, sono stati analizzati campioni cutanei e campioni siero-ematici di pazienti affetti da dermatite atopica (DA) e di soggetti sani.

* Le parti relative allo studio immunostochimico e immunoenzimatico, eseguite nelle prime fasi di questa ricerca di durata triennale, sono già state pubblicate (vedi note 18 e 19 in bibliografia). Nei capitoli seguenti verranno sinteticamente riportati le metodiche utilizzate, i risultati ottenuti e i commenti ad essi relativi, in quanto funzionali all'unitarietà della presente ricerca.

4.1 Pazienti

Il nostro studio è stato condotto in accordo alle linee guida della dichiarazione di Helsinki; ogni paziente ha fornito il proprio consenso informato per la partecipazione allo studio.

Sono stati arruolati 30 pazienti (14 maschi e 16 femmine; età mediana 46,5 anni, range: 28-68) affetti da psoriasi volgare in placche moderata/grave, senza interessamento articolare, rispondenti ai criteri di elegibilità per il trattamento con farmaci biologici (vedi Allegato 1).

I pazienti erano sovrapponibili in termini di precedenti trattamenti, durata e fase di attività della malattia. Sono stati esclusi dallo studio pazienti in trattamento sistemico e/o topico nelle 4 settimane precedenti l'inclusione nello studio; pazienti minori di anni 18; pazienti in gravidanza o in allattamento; pazienti con significative alterazioni degli esami di laboratorio riscontrate durante la fase di screening; pazienti con comorbilità non controllate; pazienti con storia o fattori di rischio per infezioni gravi, per neoplasie, per malattie linfoproliferative, per tubercolosi attiva o latente.

Quindici pazienti (6 maschi e 9 femmine, età mediana 45 anni, range 32-68) sono stati trattati con etanercept (iniezioni sottocutanee di 50 mg di farmaco

somministrate 2 volte la settimana), mentre gli altri 15 (8 maschi e 7 femmine, età mediana 48 anni, range 28-66) sono stati trattati con acitretina (0,4 mg/kg/die). Entrambi i gruppi sono stati trattati per un periodo complessivo di 12 settimane. Per controllo, sono stati inoltre arruolati 10 pazienti affetti da DA (5 maschi e 5 femmine, età mediana 41 anni, range 23-54), oltre a 10 controlli sani (5 maschi e 5 femmine, età mediana 43.5 anni, range 28-59).

Per ogni paziente è stata compilata una scheda in cui sono stati indicati la valutazione clinica (comprensiva di PASI), i parametri ematici e laboratoristici, i precedenti trattamenti e la terapia in corso; tale valutazione è stata eseguita al tempo di inclusione nello studio (T0) e al termine del trattamento (T1). Infine, ogni paziente è stato sottoposto a T0 e a T1 a biopsia cutanea e prelievo ematico per l'esecuzione delle indagini immunoistochimiche, citofluorimetriche e sierologiche. In particolare, le biopsie cutanee a T1 sono state eseguite in sedi adiacenti rispetto a quelle delle biopsie cutanee eseguite a T0.

4.2 Analisi immunoistochimica¹⁸

Come precedentemente riportato, da tutti i pazienti oggetto dello studio sono stati prelevati campioni di cute lesionale mediante *punch* da 4 mm a T0 e T1. Tali campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e quindi conservati a -80°C per poter eseguire le ricerche immunoistochimiche mediante la metodica fosfatasi alcalina/antifosfatasi alcalina (APAAP).

La metodica APAAP può essere così sintetizzata: i frammenti cutanei impiegati per la ricerca sono stati tagliati al criostato con spessore di 5µm; le sezioni così ottenute sono state montate su vetrini portaoggetto, sono state fissate per 10' in acetone e quindi fatte asciugare a temperatura ambiente per 30'.

Queste sezioni, dopo un lavaggio in Tris HCl 50 mM a pH=7,6 (TBS) per 20', sono state preincubate in camera umida per 20' con siero di capra (Normal Goat Serum) diluito 1:5 in TBS. Il siero è stato rimosso con un lavaggio in TBS e le sezioni sono state poi incubate per 2 h con gli anticorpi monoclonali anti-CD4 (DAKO), anti-CD161 (Miltenyi Biotec), anti-ROR γ t (R&D Systems) e anti-CCR6 (R&D Systems).

In seguito le sezioni montate sui vetrini portaoggetto sono state incubate per 40' con immunoglobuline di coniglio anti-topo (*rabbit anti-mouse*, RAM) (DAKO) diluite 1:30 in TBS, e dopo lavaggio sono stati processati per 40' con il complesso APAAP diluito 1:50.

Per aumentare l'intensità della marcatura, i passaggi con gli antisieri RAM e APAAP sono stati ripetuti una seconda volta. Infine, dopo un ulteriore lavaggio con TBS, i vetrini sono stati messi per 20' nel bagno di sviluppo, ottenuto miscelando al momento dell'uso le seguenti soluzioni:

- 50 mL di tampone Tris HCl 50 mM, a pH=8,7;
- 25 mg di naftolo-AS-bifosfato (Sigma) in 0,3 mL di dimetilformamide (Merk);
- 10 mg di sodio nitrito in 0,250 mL di H₂O bidistillata, ai quali sono aggiunti 0,1 mL di una soluzione di fucsina (Merk) al 5% in HCl 2N;
- 18 mg di levamisol (Sigma) sciolto in 0,1 mL di H₂O bidistillata, al fine di inibire le fosfatasi endogene.

Infine i vetrini sono stati lavati in TBS per 20', colorati con ematossilina di Mayer (Merk) precedentemente diluita 1:5 in H₂O bidistillata, sciacquati in H₂O corrente e montati con Resinmouth (Pabish).

Per ogni vetrino è stato allestito in parallelo un controllo negativo, sostituendo l'incubazione con l'anticorpo monoclonale con l'incubazione con tampone TBS. I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico. Per ogni sezione,

il numero delle cellule positive è stato calcolato da due osservatori indipendenti su tre campi (400X) adiacenti. I risultati sono stati espressi come mediana [25°-75° percentile].

4.3 Analisi immunoenzimatica (ELISA)¹⁹

I pazienti di entrambi i gruppi di trattamento sono stati sottoposti a prelievi di sangue venoso a T0 e T1. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette sterili non eparinizzate e lasciati sedimentare per 30' a temperatura ambiente e quindi centrifugati a 1200 giri/minuto per 10'. I sieri così ottenuti sono stati stoccati a -80°C.

Il dosaggio delle citochine oggetto di studio (IL-17, IL-22, IL-23) è stato effettuato con metodica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizzando i kit disponibili in commercio (R&D System, Minneapolis, USA) seguendo le istruzioni suggerite dalla casa produttrice.

Ogni misurazione è stata eseguita in duplicato; sono stati considerati ammissibili esclusivamente coefficienti di variazione tra le due misurazioni inferiori al 15%. I dati ottenuti mediante l'indagine sierologica sono stati espressi come concentrazione media \pm DS.

4.4 Analisi citofluorimetrica

Reagenti

È stato utilizzato come *medium* RPMI 1640 (VLE, Seromed, Berlino, Germania) supplementato con L-glutamina endotoxin-free 2 mM, 1% di aminoacidi non essenziali, 1% di piruvato di sodio (Sigma Chemical Co) e 2-ME 2×10^{-5} M (Merck, Darmstadt, Germania). Il PMA, la ionomicina, la brefeldina A e la

saponina sono state tutte acquistate dalla Sigma. La rIL-2 è stata acquistata dalla Novartis (Proleukin®). Gli anticorpi monoclonali anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-IL-4, anti-IFN- γ , anti-IL-17, anti-IL-8 e anti-IL-10 purificati e coniugati con i fluorocromi sono stati acquistati dalla Becton Dickinson (San Jose, CA). Gli anticorpi monoclonali isotipici di controllo purificati e coniugati ai fluorocromi sono stati acquistati dalla Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL).

Isolamento delle cellule mononucleate circolanti (PBMC)

Le PBMC dei pazienti e dei controlli sono state isolate mediante centrifugazione di sangue intero fresco secondo gradiente di Ficoll-Hypaque, seguita da due lavaggi con 0.1 M PBS pH 7.2 sterile. 1×10^6 cellule sono state stimulate in modo policlonale con PMA (10 ng/ml) e ionomicina (1 μ M) per 5 ore, di cui le ultime due in presenza di Brefeldina A (5 μ g/ml) e successivamente analizzate per la produzione intracellulare di citochine e per l'espressione di molecole di superficie mediante un citometro a flusso BDL SR II (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Isolamento dei linfociti infiltranti dalle biopsie cutanee

I linfociti T attivati sono stati isolati entro 4 ore dalle biopsie eseguite su cute lesionale dopo frammentazione meccanica delle stesse. Successivamente sono stati posti in piatti da 24 pozzetti in un *medium* contenente il 10% di FCS inattivato dal calore (HyClone, Logan, UT), in presenza di 20 IU/ml di rIL-2. Le cellule sono state ulteriormente espanse per 14 giorni mediante l'aggiunta di rIL-2 (20 U/ml) e, infine, i blasti T così ottenuti sono stati raccolti, lavati, contati e 1×10^6 cellule sono state stimulate in modo policlonale come precedentemente descritto.

Analisi citofluorimetrica della produzione di citochine

L'analisi citofluorimetrica della sintesi delle citochine è stata eseguita come

descritto in pubblicazioni precedenti.⁶⁷ Brevemente, dopo la stimolazione policlonale, il PBMC e i blasti T ottenuti dalle lesioni cutanee sono stati lavati due volte con PBS, pH 7.2, fissati per 15 min con formaldeide (2% in PBS, pH 7.2), lavati due volte con 0.5% BSA in PBS, pH 7.2, permeabilizzati con PBS pH 7.2 contenente 0.5% BSA e 0.5% saponina, e incubati per 15 min a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale specifico (anti-CD3, anti-TCR $\alpha\beta$, anti-TCR $\gamma\delta$, anti-CD4, anti-CD8, anti-IL17, anti-IFN- γ , anti-IL4, anti-IL-10 e anti-IL8). Dopo il lavaggio, le cellule sono state analizzate, determinando l'area di positività mediante un anticorpo monoclonale associato per isotipo tramite un citofluorimetro FACSCalibur, utilizzando il programma CellQuest (Becton Dickinson). In tutte le analisi citofluorimetriche, sono stati acquisiti un totale di 10^4 eventi per ogni campione, valutando le cellule CD3⁺CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ e CD3⁺CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. I risultati dell'analisi citofluorimetrica sono stati espressi come percentuale media \pm deviazione standard (DS).

4.5 Analisi statistica

I risultati della valutazione clinica (PASI) sono stati espressi come mediane [25th-75th percentile]. L'analisi statistica tra i due gruppi di pazienti psoriasici (trattati con etanercept e con acitretina) è stata eseguita mediante il test non parametrico di Mann–Whitney. Le analisi multiple tra i vari gruppi prima e dopo trattamento e i controlli sono state eseguite mediante il test non parametrico di Kruskal–Wallis con la correzione di Bonferroni. Per l'analisi statistica delle citochine sieriche è stato inoltre utilizzato il test t di Student. È stata inoltre valutata mediante il test della regressione lineare (o correlazione di Spearman) la correlazione tra i dati ottenuti dallo studio citofluorimetrico e sierologico e la gravità della malattia

valutata tramite il PASI score. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

Allegato 1

Criteri di elegibilità dei farmaci biologici (Smith CH, Anstey AV, Barker JNWN, et al. British association of Dermatologists guidelines for use of biological interventions in psoriasis 2005. Br J Dermatol 2005;153:486-9)

Per essere idonei al trattamento i pazienti devono presentare una psoriasi severa, come definito in (a) e soddisfare almeno uno dei criteri elencati in (b):

(a) Psoriasi grave richiede un PASI score > o uguale a 10 (o un BSA > 10 qualora il PASI non sia applicabile) e un DLQI > 10. Inoltre la malattia deve aver mostrato i caratteri di gravità per almeno 6 mesi, essere resistente al trattamento, tanto da dover richiedere una terapia sistemica. In situazioni particolari, ad esempio nel caso di una psoriasi acrale invalidante, anche se il paziente non soddisfa pienamente il criterio appena elencato, può ugualmente essere idoneo per il trattamento.

(b) Deve essere soddisfatto almeno uno dei seguenti criteri:

- I) Aver sviluppato o essere ad alto rischio di sviluppare importanti effetti tossici a causa delle **terapie sistemiche convenzionali**¹ o quando le terapie convenzionali non possono essere impiegate
- II) Avere o aver sviluppato intolleranza o alle terapie sistemiche (o l'impossibilità di assumerle)
- III) **Mancata risposta**² alle terapie sistemiche convenzionali
- IV) Malattia tale da richiedere continui interventi e aggiustamenti terapeutici
- V) Presentare o aver presentato condizioni cliniche o comorbidità tali da impedire l'uso di terapie sistemiche
- VI) Presentare una psoriasi grave, instabile e a rischio di vita (eritrodermia o psoriasi pustolosa generalizzata)
- VII) Presentare una artropatia psoriasica che soddisfi i criteri di elegibilità della British Society of Rheumatology per il trattamento con anti-TNF- α , in associazione alle manifestazioni cutanee

¹**Terapie sistemiche convenzionali:** acitretina, ciclosporina, metotrexate, UVB a banda stretta e PUVA-terapia.

²**Mancata risposta** alle terapie sistemiche convenzionali è definita come una risposta clinica insoddisfacente (ossia meno del 50% di miglioramento del PASI score di base o del BSA quando il PASI score non sia applicabile, o meno di 5 punti di miglioramento del DLQI di base) per almeno 3 mesi di durata del trattamento alle seguenti dosi per i singoli farmaci: ciclosporina 2.5-5 mg/kg/die; metotrexate 15-30 mg in singola somministrazione settimanale (orale, sottocutanea, intramuscolare); acitretina 25-50 mg/die; UVB a banda stretta 350 applicazioni; PUVA 150-200 applicazioni.

5.1 Analisi clinica

A T0, sia il gruppo di pazienti trattato con etanercept che quello trattato con acitretina mostravano un valore di PASI sovrapponibile (22.1 [25°-75° percentile: 17.8 – 23.6] e 22.4 [19.8 – 26], rispettivamente). Dopo 12 settimane di trattamento (T1), 10 pazienti su 15 (66%) del gruppo trattato con etanercept e 5 su 15 (33%) del gruppo trattato con acitretina hanno ottenuto una risposta di tipo PASI-75 (ovvero una riduzione del valore PASI maggiore o uguale 75% rispetto al PASI iniziale), mentre 14 pazienti su 15 (93%) del gruppo trattato con etanercept e 10 su 15 (66%) del gruppo trattato con acitretina hanno ottenuto una risposta di tipo PASI-50 (ovvero una riduzione del valore PASI maggiore o uguale al 50% rispetto al PASI iniziale). Il valore mediano PASI era significativamente inferiore a T1 rispetto a T0 in entrambi i gruppi (etanercept: 4.2 [2.4 – 6.3], $p < 0.001$; acitretina: 10.3 [6 – 15.1], $p < 0.001$). Tuttavia, a T1, il gruppo trattato con etanercept mostrava valori PASI significativamente inferiori rispetto al gruppo trattato con acitretina ($p = 0.002$).

5.2 Analisi immunoistochimica¹⁸

Nella cute dei pazienti psoriasici, i linfociti T CD4⁺ erano localizzati prevalentemente a livello del derma papillare e in sede perivascolare nel derma superficiale, con alcuni elementi a livello degli strati epidermici più profondi. Il loro numero, valutato nelle lesioni di entrambi i gruppi (trattati con etanercept o acitretina), era sovrapponibile a quello riscontrato nei pazienti affetti da DA (etanercept: 84[79.5-97.7], acitretina: 82[74.5-91.7], DA: 79[72.5-80.7], rispettivamente).

Sia etanercept che acitretina erano in grado di determinare una riduzione significativa del numero dei linfociti CD4⁺ a T1 rispetto a T0 (etanercept: 26[19.5-31.5], T0 vs T1: $p < 0.0001$; acitretina: 41[35.5-52.2], T0 vs T1 $p = 0.007$). Inoltre, le biopsie cutanee dei pazienti trattati con etanercept mostravano un numero di linfociti T CD4⁺ ridotto rispetto a quanto riscontrato nei pazienti trattati con acitretina, seppur senza una evidente significatività statistica ($p = 0.08$).

Le cellule CD161⁺ erano localizzate nelle stesse aree delle cellule CD4⁺. Il loro numero era significativamente aumentato in entrambi i gruppi di pazienti psoriasici rispetto ai pazienti con DA (etanercept: 35[27-38.7]; acitretina: 34[30.5-37.5]; DA: 4[1.5-5.7]). A T1, il numero delle cellule CD161⁺ era significativamente ridotto nei pazienti trattati con etanercept ma non in quelli trattati con acitretina (etanercept: 8[5.2-9.7], T0 vs T1: $p < 0.0001$; acitretina: 23[16.7-28.5], T0 vs T1: $p = ns$). Inoltre, non venivano riscontrate differenze nel numero di cellule CD161⁺ tra i pazienti trattati con etanercept a T1 e i pazienti con DA.

Come precedentemente descritto per CD4 e CD161, la marcatura immunoistochimica per ROR γ t era prevalentemente distribuita a livello delle aree

perivascolari e papillari del derma superficiale all'interno dell'infiltrato infiammatorio e, in minor misura, nell'epidermide. Il numero delle cellule ROR γ ⁺ presenti a livello della cute lesionale era significativamente elevato in entrambi i gruppi di pazienti psoriasici a T0 rispetto ai pazienti con DA, dove l'espressione di tale molecola veniva riscontrata esclusivamente in 6 frammenti cutanei su 10 (etanercept: 16.5[15-18.7]; acitretina: 17[12.7-18.7]; DA: 1.5[0-3.5]; gruppo etanercept e gruppo acitretina vs DA: $p < 0.0001$). A T1, le cellule ROR γ ⁺ erano significativamente ridotte rispetto a T0 nel gruppo di pazienti psoriasici trattato con etanercept (3[1.2-4.7], T0 vs T1: $p = 0.004$), ma non in quello trattato con acitretina (11[6.5-14.5], T0 vs T1: $p = ns$). Inoltre, il numero delle cellule ROR γ ⁺ era sovrapponibile nelle biopsie cutanee dei pazienti psoriasici trattati con etanercept a T1 e in quelle dei pazienti con DA.

Infine, nella cute lesionale psoriasica, la distribuzione del CCR6 era sovrapponibile a quella degli altri marcatori descritti, essendo localizzata nel contesto dell'infiltrato infiammatorio. Il numero delle cellule CCR6⁺ era sovrapponibile in entrambi i gruppi di pazienti con psoriasi a T0, mentre era significativamente ridotto nelle biopsie cutanee lesionali di pazienti con DA (etanercept: 24[19-30.2]; acitretina: 23[17.2-30.2]; DA: 5[2.2-7.7]; etanercept e acitretina vs AD: $p = 0.0003$). Le cellule CCR6⁺ risultavano ridotte a T1 sia nel gruppo trattato con acitretina che in quello trattato con etanercept, ma solo in quest'ultimo si raggiungeva la significatività statistica (etanercept: 6[3.2-10.5], T0 vs T1: $p = 0.002$; acitretina: 14[9.7-17.2], T0 vs T1: $p = ns$).

Riassumendo, mentre il numero dei linfociti CD4⁺ era sovrapponibile nelle lesioni cutanee dei pazienti con psoriasi e in quelle dei pazienti con DA, tutte le altre molecole, considerate specifiche per i linfociti Th17 e per i loro precursori, risultavano maggiormente espresse nella psoriasi rispetto alla DA. Inoltre, solo la

terapia con etanercept era in grado di ridurre in modo significativo il numero delle cellule CD161⁺, RORγ⁺ e CCR6⁺ presenti nella cute lesionale, riportandone il valore a livelli sovrapponibili a quelli riscontrati nelle lesioni cutanee di DA.

5.3 Analisi immunoenzimatica¹⁹

A livello del siero dei pazienti psoriasici prima e dopo la terapia con etanercept e acitretina, sono state analizzate le concentrazioni di IL-17, IL-22 e IL-23, citochine correlate al pattern linfocitario Th17. In particolare, IL-17 e IL-22 sono state individuate in tutti i pazienti, mentre IL-23 non è stata riscontrata né a livello del siero dei pazienti né a livello del siero dei controlli sani.

I pazienti psoriasici mostravano livelli di IL-17 significativamente superiori rispetto ai controlli sani ($p = 0.001$). Inoltre, nei pazienti con psoriasi, è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra i valori di PASI e le concentrazioni di IL-17 ($p = 0.003$). Etanercept è stato in grado di ridurre significativamente i valori di IL-17 rispetto ai valori riscontrati prima del trattamento ($p < 0.001$), mentre acitretina non ha determinato variazioni significative. Da sottolineare come, dopo 12 settimane di terapia, le concentrazioni di IL-17 presenti nei pazienti trattati con etanercept fossero sovrapponibili a quelle dei controlli sani.

Analogamente a quanto osservato per IL-17, anche i livelli di IL-22 erano più elevati nei pazienti con psoriasi rispetto ai controlli sani ($p < 0.001$). Tuttavia, non è stata riscontrata alcuna correlazione tra le concentrazioni di IL-22 e i valori di PASI. Nel gruppo trattato con etanercept, dopo 12 settimane di terapia, i valori di IL-22 risultavano ridotti rispetto a quelli riscontrati prima del trattamento ($p =$

0.01), mentre acitretina non era in grado di modificare le concentrazioni di tale citochina.

5.4 Analisi citofluorimetrica: linfociti circolanti nei pazienti con psoriasi prima del trattamento

L'analisi citofluorimetrica è stata inizialmente condotta sui linfociti CD4⁺ circolanti, valutando le percentuali dei linfociti IL-17⁺IFN- γ ⁻ (Th17), IFN- γ ⁺IL-17⁻ (Th1), IL-17⁺IFN- γ ⁺(Th17/Th1), IL-4⁺, IL-10⁺ e IL-8⁺ nei pazienti psoriasici, nei controlli sani e nei pazienti con DA (Tab.1; Fig. 1A; Fig. 2).

	Psoriasis	Healthy Controls	Atopic dermatitis
CD4⁺ T cells			
<i>IL-17⁺IFN-γ⁻</i>	2.78±1.80	0.87±0.40	0.23±0.30
<i>IL-17⁺IFN-γ⁺</i>	0.62±0.53	0.39±0.23	0.10±0.20
<i>IFN-γ⁺IL-17⁻</i>	19.99±11.03	32.68±7.02	29.65±20.42
<i>IL-4⁺</i>	1.06±0.50	1.56±0.32	2.1±0.86
<i>IL-10⁺</i>	2.05±0.93	1.99±0.80	2±1.27
<i>IL-8⁺</i>	12.11±6.67	3.69±2.69	5.83±3.04
CD8⁺ T cells			
<i>IL-17⁺IFN-γ⁻</i>	0.44±0.59	0.13±0.08	0.07±0.12
<i>IL-17⁺IFN-γ⁺</i>	0.49±0.74	0.24±0.22	0.07±0.08
<i>IFN-γ⁺IL-17⁻</i>	45.76±18.90	49.41±15.19	47.28±24.16
<i>IL-4⁺</i>	1.09±0.94	0.32±0.26	2.57±1.85
<i>IL-10⁺</i>	1.39±1.29	0.94±0.74	1.12±0.67
<i>IL-8⁺</i>	10.13±12.21	3.52±2.57	5.15±4.15

Tabella 1. Percentuali dei linfociti T circolanti CD4⁺ e CD8⁺ capaci di produrre IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-8 in pazienti con psoriasi, dermatite atopica e controlli sani; i dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

I linfociti Th17 erano maggiormente rappresentati nei pazienti con psoriasi rispetto ai controlli sani e ai pazienti con DA (psoriasi vs controlli sani: $p = 0.02$; psoriasi vs DA: $p = 0.02$). Inoltre, la coespressione di IL-17 e IFN- γ , che identifica la popolazione dei linfociti Th17/Th1 recentemente descritta,⁶⁷ risultava essere più

frequente nella psoriasi che nella DA ($p = 0.026$), mentre non venivano riscontrate differenze tra i pazienti psoriasici e i controlli sani. In accordo con tali risultati, I pazienti con psoriasi mostravano anche un maggior numero di linfociti T IL-8⁺ rispetto ai controlli sani e ai pazienti con DA (psoriasi vs controlli sani: $p < 0.001$; psoriasi vs DA: $p = 0.033$).

Sono state inoltre analizzate le cellule CD4⁺ esprimenti IL-4, per identificare i linfociti appartenenti al pattern Th2; tali cellule risultavano ridotte nei pazienti con psoriasi e nei controlli sani rispetto ai pazienti con DA (psoriasi vs controlli sani: $p = 0.006$; psoriasi vs DA: $p < 0.001$). Non sono state identificate differenze significative tra i tre gruppi presi in esame, invece, riguardo alle percentuali dei linfociti T IFN- γ ⁺IL-17⁻ (Th1) e IL-10⁺ (Tr1) (Fig. 1A).

Un dato interessante emerso in questa fase della ricerca è stato il riscontro di una correlazione tra le percentuali di linfociti circolanti IL-17⁺IFN- γ ⁻ (Th17) e IL-8⁺ presenti nei pazienti psoriasici e la gravità della malattia calcolata con l'indice PASI (Fig. 3A), mentre non è stata individuata alcuna correlazione tra la percentuale delle altre cellule analizzate e il valore di PASI stesso. Infine, era presente una correlazione tra la gravità della malattia e il rapporto tra linfociti IL-17⁺e IL-10⁺, sottolineando quindi la presenza a livello circolante dei pazienti psoriasici di uno sbilanciamento verso un pattern di tipo Th17 rispetto ad un pattern di tipo regolatorio.

Successivamente è stata analizzata l'espressione delle medesime citochine nei linfociti CD8⁺ circolanti. Non sono state riscontrate differenze tra i pazienti con psoriasi, quelli con DA e i controlli sani riguardo alle percentuali dei linfociti IL-17⁺IFN- γ ⁻, IFN- γ ⁺IL-17⁻, IL-17⁺IFN- γ ⁺, IL-10⁺ e IL-8⁺ (Fig. 1B). Unica differenza è stata riscontrata riguardo ai linfociti CD8⁺ esprimenti IL-4, che nei

pazienti psoriasici erano maggiormente rappresentate rispetto ai controlli sani ma nettamente ridotte rispetto ai pazienti con DA (psoriasi vs controlli sani: $p = 0.016$; psoriasi vs DA: $p = 0.007$)(Fig. 1B). Al contrario di quanto riscontrato per i linfociti $CD4^+$ circolanti, non è stata identificata alcuna correlazione tra la percentuale dei linfociti $CD8^+$ circolanti nei pazienti psoriasici e i valori di PASI.

5.5 Analisi citofluorimetrica: linfociti T lesionali nei pazienti con psoriasi prima del trattamento

Per valutare la presenza di eventuali differenze tra i reperti ottenuti a livello circolante e quelli relative all'organo bersaglio della malattia, sono stati isolati linfociti T attivati dalle lesioni cutanee dei pazienti con psoriasi e, per controllo, anche dalla cute dei pazienti atopici. Tali linfociti sono stati poi espansi in vitro ed infine ne è stata valutata la capacità di produrre citochine a seguito di una stimolazione policlonale (Tab. 2; Fig. 2; Fig. 4A).

	Psoriasis	Atopic dermatitis
CD4⁺ T cells		
<i>IL-17⁺IFN-γ⁻</i>	18.14±11.65	2.88±0.89
<i>IL-17⁺IFN-γ⁺</i>	8.41±5.11	1.1±0.55
<i>IFN-γ⁺IL-17⁻</i>	42.34±24.56	47.28±17.17
<i>IL-4⁺</i>	2.01±1.26	20.54±7.21
<i>IL-10⁺</i>	2.58±2.13	3.2±2.11
<i>IL-8⁺</i>	8.27±3.96	7.56±5.65
CD8⁺ T cells		
<i>IL-17⁺IFN-γ⁻</i>	3.29±5.22	0.94±1.15
<i>IL-17⁺IFN-γ⁺</i>	4.14±3.21	1.1±0.95
<i>IFN-γ⁺IL-17⁻</i>	77.23±13.34	63.3±25.92
<i>IL-4⁺</i>	13.8±14.38	2.47±3.36
<i>IL-10⁺</i>	1.13±0.90	0.8±0.41
<i>IL-8⁺</i>	4.76±3.52	3.02±2.44

Tabella 2. Percentuali dei linfociti T lesionali $CD4^+$ e $CD8^+$ capaci di produrre IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-8 in pazienti con psoriasi, dermatite atopica e controlli sani; i dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Per quanto riguarda i linfociti CD4⁺, la percentuale di quelli IL-17⁺IFN- γ ⁻ e IL-17⁺IFN- γ ⁺ era maggiore nella cute psoriasica rispetto a quella atopica ($p = 0.009$ e $p = 0.004$, rispettivamente). Al contrario, non vi erano differenze significative relativamente alla percentuale dei linfociti IFN- γ ⁺IL-17⁻, IL-10⁺ e IL-8⁺, mentre, come ci si attendeva, il numero dei linfociti Th2 esprimenti IL-4 era significativamente ridotto nelle lesioni cutanee dei pazienti con psoriasi rispetto a quelli con DA ($p < 0.001$).

Come era stato precedentemente rilevato riguardo ai linfociti CD4⁺ circolanti, veniva riscontrata una correlazione diretta tra la percentuale dei linfociti Th17, Th17/Th1 e IL-8⁺ presenti nelle lesioni cutanee dei pazienti con psoriasi e la gravità della malattia (Fig. 3B), analogamente ad una correlazione di quest'ultima con il rapporto tra linfociti IL-17⁺ e IL-10⁺. Una correlazione inversa era invece riscontrabile tra la percentuale di linfociti lesionali di tipo regolatorio secernenti IL-10⁺ e i valori di PASI (Fig. 3B).

Sono stati isolate dalla cute e analizzati anche i linfociti CD8⁺ (Tab. 2; Fig. 4B), con risultati sovrapponibili a quelli dei linfociti CD4⁺. Infatti, sia le cellule IL-17⁺IFN- γ ⁻ che quelle IL-17⁺IFN- γ ⁺ erano maggiormente rappresentate a livello cutaneo lesionale nella psoriasi che nella DA ($p = 0.04$ per entrambe le popolazioni cellulari). Al contrario non le percentuali di linfociti T IFN- γ ⁺IL-17⁻, IL-10⁺ e IL-8⁺ erano sovrapponibili nella psoriasi e nella DA, mentre, come riscontrato per i linfociti CD4⁺, anche i linfociti infiltranti CD8⁺ in grado di esprimere IL-4 erano maggiormente rappresentati nella DA rispetto alla psoriasi ($p = 0.004$).

Infine, è stata identificata una correlazione positiva tra la percentuale di linfociti

CD8⁺ esprimenti IL-17 localizzati nella cute lesionale dei pazienti con psoriasi e la gravità della malattia (Fig. 3C).

5.6 Analisi citofluorimetrica: effetto di etanercept e acitretina sui linfociti T circolanti nei pazienti con psoriasi

Nella fase successive dello studio, è stato valutato l'effetto della terapia con etanercept e con acitretina sulle popolazioni linfocitarie CD4⁺ e CD8⁺ (Tab. 3; Fig. 5).

	Blood		Skin	
	After etanercept	After acitretin	After etanercept	After acitretin
CD4⁺ T cells				
<i>IL-17⁺IFN-γ⁻</i>	0.99±0.65	2.34±0.67	7.10±8.25	19.07±4.51
<i>IL-17⁺IFN-γ⁺</i>	0.35±0.27	0.78±0.38	6.26±5.36	8.02±2.46
<i>IFN-γ⁺IL-17⁻</i>	27.72±6.46	21.87±6.21	41.89±11.97	44.78±16.76
<i>IL-4⁺</i>	1.19±0.55	1.03±0.94	2.06±1.52	2.47±1.73
<i>IL-10⁺</i>	2.06±0.87	1.89±0.92	6.08±3.11	2.87±1.22
<i>IL-8⁺</i>	5.64±1.91	10.13±6.26	4.04±4.81	6.72±2.71
CD8⁺ T cells				
<i>IL-17⁺IFN-γ⁻</i>	0.09±0.12	0.40±0.42	0.82±0.67	2.97±1.41
<i>IL-17⁺IFN-γ⁺</i>	0.16±0.19	0.31±0.35	1.04±0.85	3.42±1.92
<i>IFN-γ⁺IL-17⁻</i>	55.51±15.71	50.95±23.54	75.22±14.57	72.94±13.03
<i>IL-4⁺</i>	0.95±0.97	1.05±0.91	2.04±1.53	2.01±1.41
<i>IL-10⁺</i>	0.91±0.77	1.14±1.52	1.87±1.35	1.21±0.67
<i>IL-8⁺</i>	2.94±2.29	12.67±16.56	1.89±1.29	3.42±1.79

Tabella 2. Percentuali dei linfociti T circolanti e lesionali CD4⁺ e CD8⁺ capaci di produrre IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-8 in pazienti con psoriasi, prima e dopo trattamento con etanercept o acitretina; i dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Nonostante entrambi i trattamenti si siano dimostrati efficaci nella riduzione delle lesioni psoriasiche dopo 12 settimane, solo etanercept è stato in grado di ridurre in modo statisticamente significativo la percentuale dei linfociti circolanti IL-17⁺IFN- γ ⁻ CD4⁺ nei pazienti psoriasici, mentre l'acitretina non ha dimostrato tale

attività ($p = 0.002$) (Fig. 5A). Inoltre, è interessante rilevare che i pazienti trattati con etanercept mostravano percentuali di linfociti Th17 circolanti simili a quelli dei controlli sani, mentre i pazienti trattati con acitretina continuavano a mostrare percentuali di queste cellule significativamente più elevate (post-acitretina vs controlli sani: $p = 0.009$).

Al contrario, nessuna delle due terapie utilizzate è stata in grado di modificare significativamente le percentuali dei linfociti circolanti IL-17⁺IFN- γ ⁺ (Fig. 5A), anche se i pazienti psoriasici trattati con etanercept mostravano una riduzione di tali cellule, definite Th17/Th1, rispetto a quelli trattati con acitretina ($p = 0.002$). Inoltre, solo etanercept riduceva il numero dei linfociti circolanti capaci di produrre IL-8 dopo 12 settimane di terapia ($p = 0.002$) (Fig. 5A). In accordo con tale risultato, i pazienti trattati con etanercept, al contrario di quelli trattati con acitretina, mostravano percentuali di linfociti IL-8⁺ sovrapponibili a quelli dei controlli sani (post-etanercept vs post-acitretina: $p = 0.017$).

Infine, non sono state riscontrate differenze nelle percentuali delle cellule IFN- γ ⁺ IL-17⁻, IL-4⁺ e IL-10⁺ nei due gruppi di trattamento (Fig. 5A).

Analogamente a quanto osservato per le popolazioni linfocitarie CD4⁺, anche i linfociti CD8⁺ con fenotipo Th17 risultavano ridotti nei pazienti trattati con etanercept. Come mostrato in Fig. 5B, infatti, un trattamento di 12 settimane con etanercept era in grado di diminuire la percentuale dei linfociti IL-17⁺IFN- γ ⁻ ($p = 0.024$) e IL-8⁺ ($p < 0.001$) rispetto ai valori riscontrati nei pazienti non trattati. Inoltre, le percentuali di tali cellule erano significativamente inferiori nel gruppo trattato con etanercept rispetto a quello trattato con acitretina ($p = 0.014$ e $p = 0.039$, rispettivamente).

Al contrario, non sono state riscontrate differenze relative alla percentuale dei linfociti CD8⁺ con fenotipo IFN- γ ⁺ IL-17⁻, IFN- γ ⁺, IL-4⁺ e IL-10⁺ nei due gruppi di trattamento (Fig. 5B).

5.7 Analisi citofluorimetrica: effetto di etanercept e acitretina sui linfociti T lesionali nei pazienti con psoriasi

Analogamente a quanto riscontrato a livello circolante, anche a livello delle lesioni cutanee psoriasiche è stata osservata una riduzione significativa rispetto ai valori basali dei linfociti Th17, caratterizzati dal fenotipo IL-17⁺IFN- γ ⁻ CD4⁺, dopo il trattamento eseguito con etanercept ($p = 0.046$), mentre nessuna differenza è stata riscontrata dopo acitretina (Tab. 3; Fig. 6A). In Fig. 7, sono riportati gli istogrammi relativi ai linfociti secernenti IL-17 di un caso rappresentativo. Inoltre, dopo 12 settimane di terapia, la percentuale di linfociti T IL-17⁺ era significativamente inferiore nei pazienti trattati con etanercept rispetto a quelli trattati con acitretina ($p = 0.001$). Allo stesso modo, la proporzione dei linfociti CD4⁺ esprimenti IL-8 era significativamente ridotta rispetto ai valori pre-terapia nei pazienti trattati con etanercept ($p = 0.049$) ma non con acitretina (Fig. 6A). Altro dato interessante è risultata essere la capacità di etanercept di incrementare le percentuali dei linfociti Tr1 IL-10⁺ nella cute dei pazienti psoriasici rispetto ai valori dimostrati prima della terapia ($p = 0.014$), cosa che invece non è stata riscontrata dopo la terapia con acitretina (Fig. 6A). In accordo con tale risultato, la percentuale di tali cellule era statisticamente più elevata nel gruppo trattato con etanercept rispetto a quello trattato con acitretina ($p = 0.01$). Le percentuali dei

linfociti T $IL-17^+IFN-\gamma^+$, $IFN-\gamma^+IL-17^-$, e $IL-4^+$, invece, sono rimaste inalterate dopo entrambi i trattamenti (Fig. 6A).

Abbiamo in seguito valutato se tali effetti esercitati da etanercept e acitretina sui linfociti $CD4^+$ presenti nelle lesioni cutanee della psoriasi potessero essere riscontrati anche a carico dei linfociti $CD8^+$ (Tab. 3; Fig. 6B). In accordo con i risultati ottenuti in precedenza, la terapia con etanercept si è dimostrata capace di ridurre significativamente, rispetto ai valori ottenuti nei pazienti non trattati, le percentuali dei linfociti T $CD8^+$ secernenti $IL-17^-$ e $IL-17/IFN-\gamma^-$ ($p = 0.049$ e $p = 0.024$, rispettivamente), mentre la terapia con acitretina non ha mostrato tale attività. Da sottolineare che il gruppo trattato con etanercept mostrava valori di linfociti T $IL-17^+IFN-\gamma^-$ e $IL-17^+IFN-\gamma^+$ sovrapponibili a quelli riscontrati nelle lesioni cutanee di DA e significativamente inferiori rispetto ai pazienti trattati con acitretina ($p < 0.001$ e $p = 0.003$, rispettivamente). Come osservato in precedenza, anche i linfociti T $CD8^+$ secernenti $IL-8$ erano significativamente ridotti a livello cutaneo dopo il trattamento con etanercept ($p = 0.007$), ma non dopo quello con acitretina. Nessuno dei due farmaci è stato in grado di modificare le percentuali dei linfociti $CD8^+$ lesionali secernenti $IFN-\gamma$, $IL-4$ o $IL-10$.

Capitolo 6

Discussione

La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica cutanea a patogenesi immunomediata in cui è stato dimostrato un ruolo patogenetico determinante da parte dei linfociti T. Negli ultimi anni numerosi studi hanno tentato di chiarire i meccanismi molecolari alla base della malattia, con particolare riferimento al ruolo di alcune popolazioni linfocitarie potenzialmente coinvolte nella risposta infiammatoria alla base delle manifestazioni cutanee della psoriasi.

In particolare, numerosi dati sperimentali hanno inizialmente dimostrato come i linfociti T polarizzati in senso Th1 fossero in grado di promuovere e mantenere la flogosi riscontrata nella cute lesionale dei pazienti psoriasici. Come rilevato in precedenza, tuttavia, negli ultimi anni è emerso che un'altra popolazione linfocitaria recentemente identificata, quella dei linfociti Th17, sia determinante per lo sviluppo della malattia mediante la secrezione di citochine capaci di attività pro-infiammatoria, tra cui l'IL-17, e citochine in grado di promuovere l'iperproliferazione e l'alterata differenziazione dei cheratinociti, come l'IL-22.

Numerosi elementi rimangono tuttavia da chiarire relativamente al ruolo dei linfociti T nella patogenesi della psoriasi. In particolare, le conoscenze relative alla correlazione delle varie popolazioni linfocitarie potenzialmente implicate

nella malattia (Th1, Th2, Th17, Tregs) con la gravità delle manifestazioni cliniche e con la risposta alle terapie, tra cui le moderne terapie biologiche basate sull'inibizione del TNF- α , sono ancora estremamente limitate.

Nel presente studio, abbiamo approfondito tali argomenti mediante una accurata analisi dei linfociti T appartenenti a vari pattern immunologici, con particolare attenzione al pattern Th17, nei pazienti con psoriasi. Tali indagini sono state condotte sia a livello della cute lesionale che del sangue circolante prima e dopo il trattamento con un farmaco anti-TNF α , l'etanercept, e con un farmaco di controllo di provata efficacia nella terapia della psoriasi, l'acitretina, appartenente alla classe dei retinoidi.

Innanzitutto l'indagine clinica, valutata tramite il calcolo del PASI prima e dopo un trattamento della durata di 3 settimane, ha evidenziato come entrambi i farmaci risultassero significativamente efficaci nella riduzione delle manifestazioni psoriasiche. L'etanercept, tuttavia, determinava una risposta clinica significativamente maggiore rispetto all'acitretina, dimostrando di avere una efficacia superiore come già evidenziato in studi precedenti.^{18,19}

Successivamente, nella prima fase di tipo sperimentale dello studio, sono state condotte un'indagine immunoistochimica volta alla valutazione dei marcatori specifici dei linfociti Th17 e dei loro precursori (in particolare ROR γ t, CD161 e CCR6) nelle lesioni cutanee dei pazienti psoriasici¹⁸ e un'indagine immunoenzimatica per l'analisi sierologica delle principali citochine prodotte da tali linfociti Th17 (IL-17, IL-22, IL23).¹⁹ Tali indagini sono state eseguite in pazienti psoriasici non in trattamento e dopo terapia con etanercept e acitretina.

I risultati dell'analisi immunistochemica, in seguito confermati da studi successivi, hanno dimostrato che i linfociti Th17 e i loro precursori sono presenti nella psoriasi e il loro numero è significativamente maggiore rispetto alla DA, altra malattia cronica in cui i linfociti T svolgono un ruolo primario dal punto di vista patogenetico. Dopo il trattamento con etanercept, il numero di tali risultava significativamente inferiore rispetto a quello riscontrato nei pazienti trattati con acitretina, suggerendo un'attività inibitoria specifica di tale farmaco sul pattern dei linfociti Th17.¹⁸

Analogamente, il nostro studio sierologico ha dimostrato nei pazienti psoriasici non trattati un aumento delle citochine secrete dai linfociti Th17, che si riducevano fino a raggiungere valori comparabili a quelli dei soggetti sani di controllo esclusivamente nel gruppo trattato con etanercept.¹⁹

Tali risultati hanno rappresentato quindi una conferma del ruolo dei linfociti Th17 nella patogenesi della psoriasi e del possibile effetto inibitorio specifico di etanercept su tale popolazione cellulare, costituendo quindi una premessa per la seconda parte di tipo sperimentale di questa ricerca.

In quest'ultima, è stata condotta un'indagine di tipo citofluorimetrico sulle popolazioni linfocitarie T CD4⁺ e CD8⁺ in grado di esprimere IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-8 sia a livello cutaneo che del sangue circolante nei pazienti con psoriasi volgare. Anche in questo caso sono stati valutati gli effetti di etanercept e, come terapia di controllo, di acitretina, sulle variazioni dinamiche di tali cellule.

Per prima cosa abbiamo valutato la percentuale delle varie sottopopolazioni linfocitarie T in 30 pazienti con psoriasi non trattati, confrontando i risultati con quelli ottenuti in soggetti sani di controllo e in pazienti con DA. Il dato principale

emerso dalla nostra analisi è stata la presenza di un numero significativamente elevato di linfociti Th17 e Th17/Th1 nelle lesioni cutanee e nel sangue circolante di pazienti con psoriasi rispetto ai controlli, dato che ci ha permesso di confermare il ruolo di tali cellule nella patogenesi della malattia, come riportato in numerosi studi della Letteratura.⁷⁴⁻⁷⁹ In particolare, mentre i linfociti Th17 e Th17/Th1 localizzati a livello cutaneo svolgono probabilmente un ruolo di primo piano nell'induzione delle lesioni psoriasiche attraverso la produzione di numerose citochine patogenetiche tra cui l'IL-8 e le già ricordate IL-17 e IL-22, quelli riscontrati a livello circolante possono rappresentare sia cellule in transito da o verso la cute,²⁰ sia cellule responsabili della flogosi di tipo sistemico riscontrata comunemente nei pazienti psoriasici, idi cui le più comuni espressioni fenotipiche di tipo patologico sono costituite dalla psoriasi artropatica e dell'aterosclerosi.⁸³

Inoltre, pur in contrasto con un precedente lavoro,²⁰ ma in accordo con Zhang e collaboratori,⁸⁴ il nostro studio ha dimostrato una diretta correlazione tra le percentuali dei linfociti T CD4⁺ presenti a livello lesionale e a livello circolante in grado di produrre IL-17 da sola (linfociti Th17) o in combinazione con IFN- γ (linfociti Th17/Th1) e la gravità della psoriasi espressa mediante il valore di PASI. Da sottolineare come tale dato rappresenti una ulteriore conferma del rilevante ruolo patogenetico di queste due popolazioni linfocitarie nella patogenesi della malattia.

Analogamente a quanto riscontrato per i linfociti T CD4⁺, anche i linfociti T CD8⁺ con fenotipo Th17 e Th17/Th1 erano aumentati nella cute psoriasica rispetto a quella dei pazienti con DA utilizzati come controllo. In accordo con tali risultati, alcuni studi hanno recentemente dimostrato un incremento dei linfociti T CD8⁺ IL-17-secerenti nelle lesioni cutanee di pazienti con psoriasi,^{22,85}

suggerendo che non solo i linfociti T helper CD4⁺, ma anche i linfociti T CD8⁺ siano responsabili delle alterazioni patogenetiche della cute psoriasica.

Altro risultato, ampiamente atteso, del nostro studio, che tra l'altro conferma un dato ormai acquisito della letteratura è stato il riscontro di ridotte percentuali di linfociti CD4⁺ e CD8⁺ IL-4-secerenti (pattern Th2) sia nella cute lesionale che nel sangue circolante dei pazienti psoriasici rispetto a quelli con DA, mentre non sono state evidenziate differenze nelle percentuali dei linfociti T IFN- γ ⁺ tra i pazienti con psoriasi, DA e i controlli sani. Nonostante possa apparire a prima vista piuttosto sorprendente, quest'ultimo risultato suggerisce che il peso relativo della flogosi mediata dai linfociti Th1 nella patogenesi della psoriasi vada rivalutato alla luce delle recenti acquisizioni sui linfociti Th17, confermando che questi ultimi rappresentano probabilmente i principali protagonisti del processo immunologico che determina lo sviluppo della malattia. In accordo con questa teoria, molto recentemente Res et al²² hanno dimostrato una percentuale sovrapponibile di linfociti T IFN- γ ⁺ presenti a livello dermico in pazienti psoriasici e in controlli sani, nonostante questi ultimi presentino un numero significativamente inferiore di linfociti T infiltranti la cute rispetto ai pazienti con psoriasi.

Infine, mentre alcuni studi hanno in precedenza analizzato il ruolo dei linfociti natural Treg Foxp3⁺ nella psoriasi,^{23,84,86-88} per la prima volta nella presente ricerca è stata valutata la popolazione dei linfociti Treg IL-10-secerenti, appartenenti al sottogruppo dei linfociti Tr1, a livello del sangue circolante e delle lesioni cutanee di pazienti con psoriasi. Nonostante il fatto che, sia a livello ematico che a livello cutaneo, non siano state individuate differenze relative alle percentuali dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺ in grado di produrre IL-10 tra pazienti con

psoriasi, pazienti con DA e controlli sani, è stata dimostrata una correlazione negativa tra la percentuale dei linfociti CD4⁺ IL-10-secerenti presenti a livello lesionale e la gravità delle manifestazioni cutanee della psoriasi calcolata mediante il PASI; tale dato suggerisce quindi che un deficit relativo della popolazione linfocitaria di tipo regolatorio dei Tr1 potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi delle lesioni psoriasiche. Altro dato interessante in accordo con tale ipotesi è risultato essere la correlazione positiva del rapporto tra cellule IL-17⁺ e IL-10⁺, definito come IL-17⁺/IL-10⁺ cell ratio, con l'estensione delle lesioni cutanee. Dal punto di vista concettuale, un aumento di tale rapporto indica una relativa maggiore presenza di linfociti T effettori patogeneticamente attivi (in questo caso linfociti Th17 IL-17⁺) con una concomitante riduzione di linfociti Treg con funzione anti-infiammatoria e immunosoppressiva (in questo caso linfociti Tr1 IL10⁺); come diretta conseguenza, risulta che la malattia si presenta con una maggiore estensione e gravità quando i linfociti Tr1 sono relativamente ridotti e quindi non in grado di controbilanciare l'aumentata attività patogenetica dei linfociti Th17.

Mentre numerosi studi hanno valutato i linfociti T in pazienti psoriasici non trattati, esistono pochi dati relative alle modificazioni di tali popolazioni cellulari dopo la terapia e, in particolare, dopo un trattamento con inibitori del TNF- α . Per quanto riguarda i linfociti Th17, Zaba e collaboratori,⁷⁵ valutando la cute lesionale e non lesionale di 20 pazienti con psoriasi, hanno dimostrato che etanercept è in grado di ridurre sia l'espressione di mediatori pro-infiammatori prodotti dalle cellule dendritiche che stimolano la proliferazione dei linfociti Th17 (in particolare l'IL-23), sia le molecole effettrici prodotte dai linfociti Th17 stessi (tra cui IL-17, IL-22, CC chemokine ligand 20, e β -defensina 4). Lo stesso gruppo

ha dimostrato che, in 15 pazienti con psoriasi, la risposta ad etanercept era correlata all'inibizione dell'espressione dei geni associati al pattern Th17.⁸⁹ Quaglino e collaboratori⁸⁸ hanno dimostrato, in una coorte di 19 pazienti psoriasici, una riduzione dell'espressione dell'RNA messaggero da parte di geni relativi ai pattern Th1 e Th17 a seguito di un trattamento di 12 settimane con etanercept. Infine Kagami et al, analizzando 5 pazienti con psoriasi trattati con infliximab, hanno dimostrato una riduzione dei linfociti Th17 a livello circolante.²⁰

In accordo con questi risultati della Letteratura, nel presente studio abbiamo dimostrato che una terapia con etanercept, al contrario di quella con acitretina, è in grado di ridurre in modo significativo la percentuale dei linfociti Th17 e dei linfociti CD8⁺ IL-17-secerenti nella cute e nel sangue circolante dei pazienti con psoriasi. Da sottolineare come, dopo 12 settimane di terapia, nei pazienti psoriasici la proporzione dei linfociti IL-17⁺ era sovrapponibile a quella dei controlli sani.

Nel complesso i nostri risultati suggeriscono che, nonostante una dimostrata efficacia di entrambi i farmaci nella riduzione delle lesioni cutanee psoriasiche, solo etanercept è in grado di inibire specificamente il pathway linfocitario Th17, mentre l'efficacia di acitretina è probabilmente legata ad altri fattori, tra cui l'azione sulla proliferazione e la differenziazione cheratinocitaria. In particolare, gli effetti di etanercept sui linfociti Th17 possono essere spiegati dalla capacità di tale farmaco di inibire la maturazione delle cellule dendritiche e la loro produzione di citochine proinfiammatorie, determinando in questo modo una riduzione nell'attivazione e, probabilmente, nella proliferazione degli stessi linfociti Th17.⁷⁵

Inoltre il TNF- α , che rappresenta la principale molecola bersaglio della terapia con etanercept, è collegato al pathway dei linfociti Th17 tramite due vie di segnale: una via diretta, in quanto in grado di indurre la secrezione di IL-17 da parte dei linfociti;⁹⁰ una via indiretta, mediata dall'induzione della produzione di IL-1 β che, a sua volta, è in grado di favorire la maturazione delle cellule dendritiche con conseguente produzione di IL-23, citochina chiave nella differenziazione dei linfociti T naïve in linfociti Th17.⁹¹ Di conseguenza, il blocco di TNF- α da parte di etanercept rappresenta una ulteriore spiegazione della riduzione dei linfociti T IL-17-secerenti a livello cutaneo e circolante nei pazienti con psoriasi.

Un altro punto interessante emerso dai nostri risultati è rappresentato dall'aumento delle percentuali dei linfociti Tr1 IL-10⁺ a livello della cute psoriasica dopo la terapia con etanercept, fenomeno che invece non è stato riscontrato nei pazienti trattati con acitretina. Dai dati in nostro possesso non è possibile stabilire se etanercept è in grado di promuovere l'espansione della sottopopolazione Tr1 dei linfociti T regolatori, oppure se il loro incremento è secondario alla concomitante riduzione dei linfociti Th17. Alcuni studi recenti, tuttavia, hanno dimostrato che gli inibitori del TNF- α inducono un aumento del numero dei Tregs e una riduzione del rapporto tra linfociti T effettori e Treg, determinando quindi un complessivo effetto anti-infiammatorio.⁹²⁻⁹⁴ In accordo con tali lavori, nel nostro studio si osservava un elevato rapporto tra i linfociti T IL-17⁺ e IL-10⁺ nelle lesioni psoriasiche prima della terapia (IL-17⁺/IL-10⁺ ratio = 7), che si riduceva notevolmente dopo la terapia con etanercept (IL-17⁺/IL-10⁺ ratio = 1.1), mentre rimaneva pressochè inalterato nel gruppo trattato con acitretina (IL-17⁺/IL-10⁺ ratio = 6.6).

Infine, i nostri risultati hanno evidenziato anche una significativa riduzione nella percentuale dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ in grado di produrre IL-8 sia a livello cutaneo che a livello circolante nei pazienti trattati con etanercept. Come è noto, l'IL-8 possiede una notevole attività chemiotattica nei confronti dei granulociti neutrofili, che rappresentano la principale popolazione cellulare riscontrata nelle lesioni psoriasiche in fase attiva.^{95,96} Dal momento che la produzione di tale citochina sembra essere indotta sia dal TNF- α che dall'IL-17,⁹⁷ la riduzione delle percentuali dei linfociti T IL-8⁺ dopo il trattamento con etanercept, ma non dopo quello con acitretina, appare del tutto coerente e può essere considerato un ulteriore meccanismo attraverso il quale si giunge alla guarigione delle lesioni cutanee nei pazienti con psoriasi.

In conclusione, il nostro studio ha fornito ulteriori evidenze sul ruolo della popolazione dei linfociti Th17 nella patogenesi della psoriasi. Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che etanercept è in grado di inibire tale pattern linfocitario in modo specifico, determinando inoltre una concomitante riduzione dell'espressione di IL-8, citochina chiave nella patogenesi delle lesioni cutanee della malattia, e del rapporto Th17/Tr1, spostando in senso tollerogenico e quindi anti-infiammatorio la risposta immunitaria presente nei pazienti psoriasici. Queste attività possono quindi contribuire alla comprovata efficacia di etanercept nel trattamento della psoriasi, suggerendone quindi l'utilizzo in altre malattie mediate dai linfociti Th17 e giustificandone la maggior attività terapeutica nei confronti di un farmaco tradizionalmente utilizzato nella psoriasi come l'acitretina.

Capitolo 7

Bibliografia

1. Fabbri P. La psoriasi. In: Fabbri P ed. Immunità e cute. Le dermatosi a patogenesi immunologica. Lingomed; Milano, Firenze, Napoli (Italia) 2012
2. Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:16-7.
3. Ragaz A, Ackerman AB. Evolution, maturation, and regression of lesions of psoriasis. New observations and correlation of clinical and histologic findings. *Am J Dermatopathol* 1979;1:199-214.
4. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009;361:496-509.
5. Jabłońska S, Jarzabek-Chorzelska M, Maciejowska E, et al. Studies on the Koebner phenomenon. *Arch Immunol Ther Exp* 1978;26:775-8.
6. Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol* 2007;25:606-15.
7. Rieder E, Tausk F. Psoriasis, a model of dermatologic psychosomatic disease: psychiatric implications and treatments. *Int J Dermatol* 2012;51:12-26.
8. Gilhar A, David M, Ullmann Y, et al. T-lymphocyte dependence of psoriatic pathology in human psoriatic skin grafted to SCID mice. *J Invest Dermatol* 1997;109:283-8.
9. Antiga E, Caproni M. La patogenesi della psoriasi. In: Fabbri P ed. Immunità e cute. Le dermatosi a patogenesi immunologica. Lingomed; Milano, Firenze, Napoli (Italia) 2012.

10. Roberson ED, Bowcock AM. Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet* 2010;26:415-23.
11. Valdimarsson H. The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007;25:563-7.
12. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol* 2003;148:233-5.
13. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg* 2010;29:3-9.
14. Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2011;303:691-705.
15. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:79-88.
16. Dunphy S, Gardiner CM. NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:248317.
17. Tonel G, Conrad C, Laggner U, et al. Cutting edge: A critical functional role for IL-23 in psoriasis. *J Immunol* 2010;185:5688-91.
18. Antiga E, Volpi W, Chiarini C, et al. The role of etanercept on the expression of markers of T helper 17 cells and their precursors in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:767-74.
19. Caproni M, Antiga E, Melani L, et al. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *J Clin Immunol* 2009;29:210-4.
20. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010;130:1373-83.
21. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT, et al. Psoriasis: from pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Clin Sci* 2011;120:1-11.
22. Res PC, Piskin G, de Boer OJ, et al. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS One* 2010;5:e14108.

23. Yun WJ, Lee DW, Chang SE, et al. Role of CD4CD25FOXP3 Regulatory T Cells in Psoriasis. *Ann Dermatol* 2010;22:397-403.
24. Tsuruta D. NF-kappaB links keratinocytes and lymphocytes in the pathogenesis of psoriasis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009;3:40-8.
25. Chua RA, Arbiser JL. The role of angiogenesis in the pathogenesis of psoriasis. *Autoimmunity* 2009;42:574-9.
26. Mosmann TR, Cherwinski C, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cells clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
27. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73
28. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263-6
29. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Immunologia cellulare e molecolare* (sesta edizione). Elsevier Masson, 2008.
30. Nelson DL, Cox MM. *I principi di biochimica di Lehninger* (terza edizione). Zanichelli, 2002
31. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis research and Therapy* 2008;10: 206-12
32. Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, et al. Polarization of IL-4 and IFN-gamma-producing CD41 T cells following activation of naive CD41 T cells. *J Immunol* 1997;158:1085-94.
33. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, et al. T helper cell fate specified by kinase mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005;307:430-3.
34. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
35. Park H, Yang XO, Chang SH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1069-70.
36. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin-17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.

37. Nakae S, Iwakura Y, Suto H, et al. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 2007;81:1258-68.
38. Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN- γ shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 2000;164:2759-68.
39. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, et al. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2004;200:79-87.
40. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;44:235-8.
41. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor beta induces development of the Th17 lineage. *Nature* 2006;441:231-4.
42. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins C, et al. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports differentiation of IL-17 producing T cells. *Immunity* 2006;25:179-89.
43. Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6 dependent and independent pathways in the development of interleukin-17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12099-104.
44. Cua DJ, Kastelein RA. TGF- β , a "double agent" in the immunopathology war. *Nat Immunol* 2006;7:557-9.
45. Steinman L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139-45.
46. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:345-50.
47. Acosta Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942-9.

48. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950-7.
49. Chen Z, Tato CM, Muul L, et al. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2007;56:2936-46.
50. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human Th17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 2008;9:641-9.
51. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor- β , interleukin-23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th17 responses. *Nat Immunol* 2008;9:588-90.
52. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of Th 17 cells. *Nature* 2008;454:350-2.
53. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, et al. Human Interleukin-17-producing cells originate from a CD161+ CD4+ T-cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903-16.
54. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7:937-45.
55. Matusiewicz D, Kivisakk P, He B, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5:101-4.
56. Kebir H, Kteymborg K, Ifergan I, et al. Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007;13:1173-5.
57. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103:1345-52.
58. Honorati MC, Meliconi R, Pulsatelli L, et al. High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients. *Reumatology* 2001;40:522-7.

59. Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000;9:589-93.
60. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2455-63.
61. Nielsen OH, Kirman I, Rudiger L, et al. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:180-5.
62. Fujinon S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
63. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL-17F p. His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:437-45.
64. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G, et al. IL-17 is produced by nickel-specific lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1999;162:494-502.
65. Van Beelen AJ, Teunissen MBM, Kapsenberg ML, et al. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:374-81.
66. O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth C, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:603-9.
67. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.
68. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, et al. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4+ T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:222-30.
69. Wang YH, Voo KS, Liu B, et al. A novel subset of CD4+ Th2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med* 2010;207:2479-91.

70. Gottlieb A, Menter A, Mendelsohn A, et al. Ustekinumab, a human interleukin 12/23 monoclonal antibody, for psoriatic arthritis: randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet* 2009;373:633-40.
71. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007;445:866-73.
72. Boyman O, Conrad C, Tonel G, et al. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol* 2004;25:295-305.
73. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, et al. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 1994;102:145-9.
74. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 2004;199:125-30.
75. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med* 2007;204:3183-94.
76. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007;445:648-51.
77. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009;129:1339-50.
78. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008;128:1207-11.
79. Chen L, Shen Z, Wang G, et al. Dynamic frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2008;51:200-3.
80. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005;174:164-73.
81. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The Family of IL-10-secreting CD4⁺ T cells. *Adv Immunol* 2010;105:99-130.
82. Chong BF, Wong HK. Immunobiologics in the treatment of psoriasis. *Clin Immunol* 2007;123:129-38.

83. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, et al. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA* 2006;296:1735-41.
84. Zhang L, Yang XQ, Cheng J, et al. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin Immunol* 2010;135:108-17.
85. Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol* 2008;181:4733-41.
86. Quaglino P, Ortoncelli M, Comessatti A, et al. Circulating CD4+CD25 bright FOXP3+ T cells are up-regulated by biological therapies and correlate with the clinical response in psoriasis patients. *Dermatology* 2009;219:250-8.
87. Diluvio L, Romiti ML, Angelini F, et al. Infliximab therapy induces increased polyclonality of CD4+CD25+ regulatory T cells in psoriasis. *Br J Dermatol* 2010;162:895-7.
88. Quaglino P, Bergallo M, Ponti R, et al. Th1, Th2, Th17 and Regulatory T Cell Pattern in Psoriatic Patients: Modulation of Cytokines and Gene Targets Induced by Etanercept Treatment and Correlation with Clinical Response. *Dermatology* 2011;223:57-67.
89. Zaba LC, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, et al. Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1022-10.e1-395.
90. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-52.
91. Sutton C, Brereton C, Keogh B, et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006;203:1685-91.
92. Biton J, Semerano L, Delavallée L, et al. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol* 2011;186:3899-910.
93. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α

- therapy. *J Exp Med* 2004;200:277-85.
94. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J Exp Med* 2007;204:33-9.
95. Duan H, Koga T, Kohda F, et al. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis. *J Dermatol Sci* 2001;26:119-24.
96. Coimbra S, Oliveira H, Reis F, et al. Interleukin (IL)-22, IL-17, IL-23, IL-8, vascular endothelial growth factor and tumour necrosis factor- α levels in patients with psoriasis before, during and after psoralen-ultraviolet A and narrowband ultraviolet B therapy. *Br J Dermatol* 2010;163:1282-90.
97. Pietrzak AT, Zalewska A, Chodorowska G, et al. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta* 2008;394:7-21.

Capitolo 8

Appendice iconografica

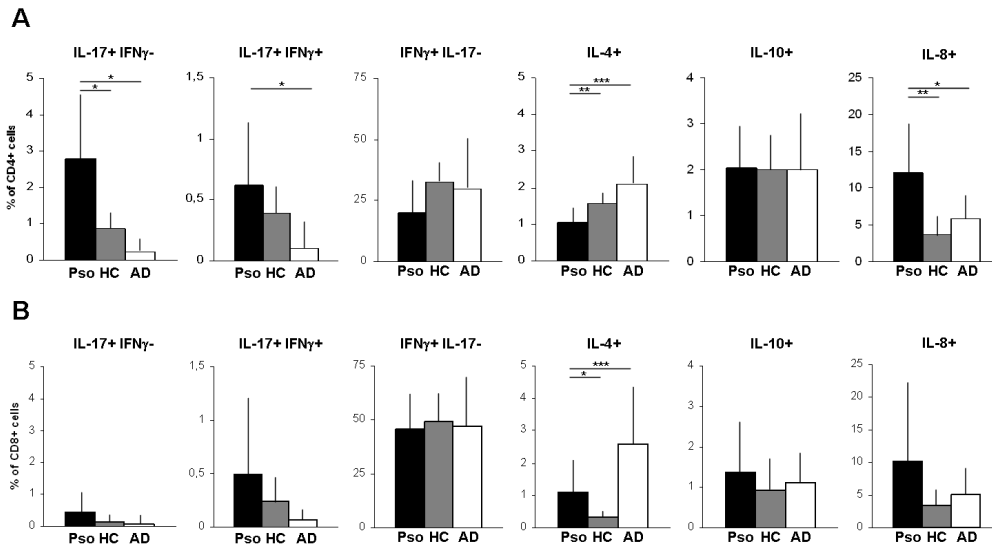


Fig. 1. I linfociti T circolanti dei pazienti con psoriasi presentano un fenotipo di tipoTh17. I linfociti T circolanti di pazienti con psoriasi (Pso), dermatite atopica (AD) e controlli sani (HC) sono stati attivati in modo policlonale *in vitro* e valutati per l'espressione intracellulare di varie citochine mediante citofluorimetria. Nel grafico sono riportate le percentuali (media \pm deviazione standard) dei linfociti CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) esprimenti IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 o IL-8. *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

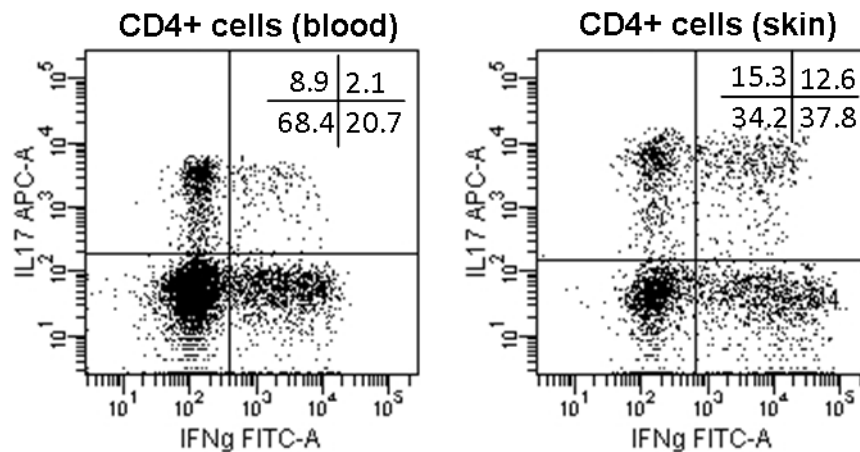


Fig. 2. Una notevole percentuale dei linfociti CD4⁺ circolanti o lesionali prelevati da pazienti con psoriasi esprime IL-17. Cellule mononucleate circolanti o linfociti T attivati isolati dalle lesioni cutanee di pazienti con psoriasi sono stati attivati *in vitro* e valutati per l'espressione di IL-17 e IFN- γ mediante citofluorimetria. Nell'immagine è riportato l'immunofenotipo dei linfociti CD4⁺ di un caso rappresentativo.

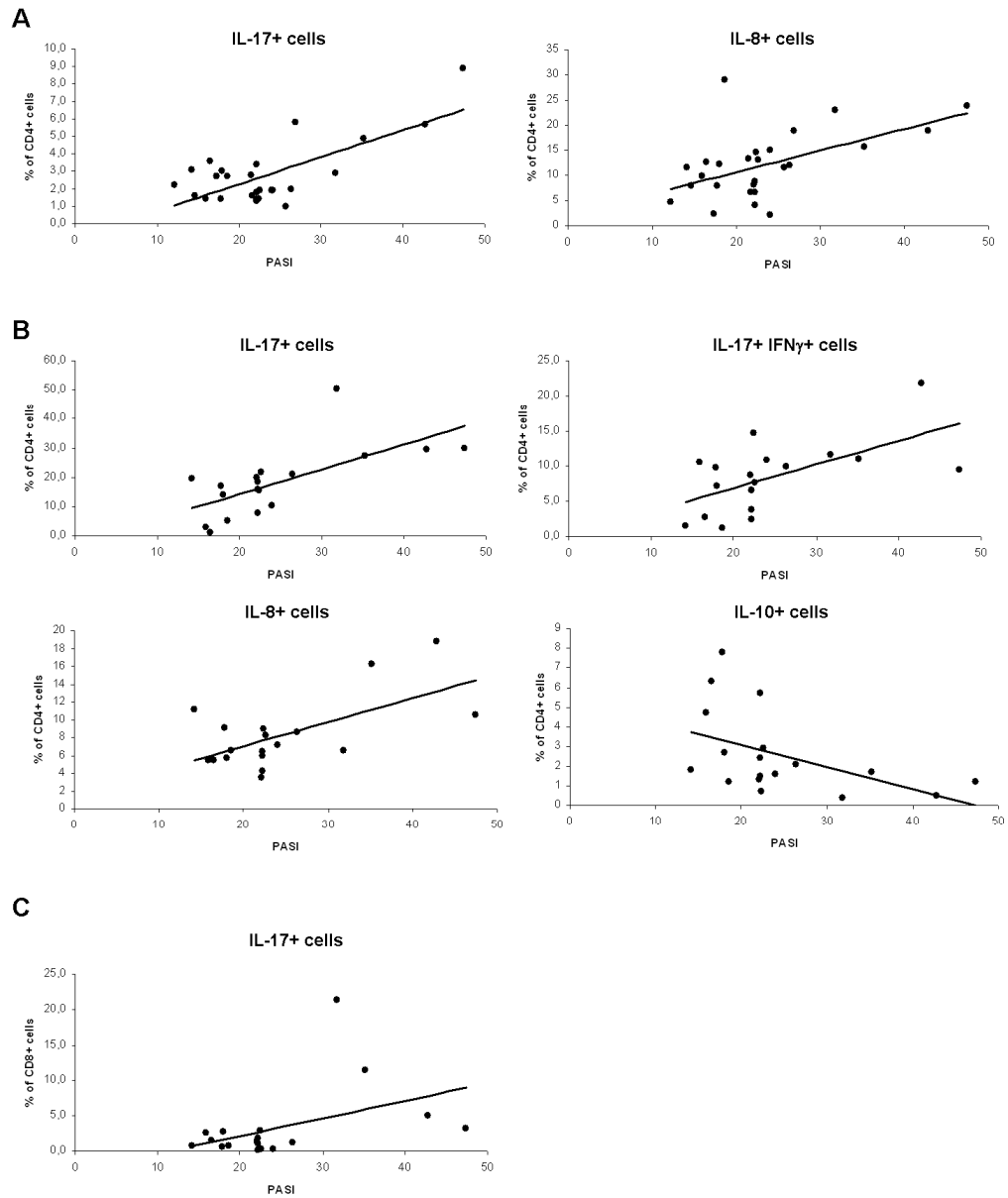


Fig. 3. Le percentuali dei linfociti T IL-17- e IL-8-secernenti correlano con la gravità della psoriasi. Le percentuali dei linfociti T CD4⁺ circolanti (A) e lesionali (B), e dei linfociti T CD8⁺ lesionali (C) di pazienti con psoriasi sono state correlate con la gravità della malattia calcolata tramite il PASI.

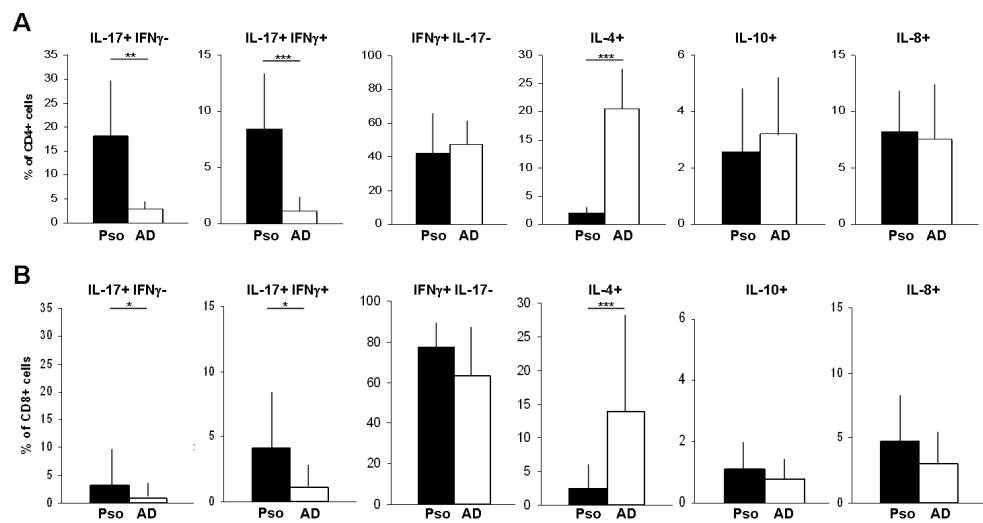


Fig. 4. I linfociti T lesionali prelevati da pazienti con psoriasi esprimono un fenotipo di tipo Th17. I linfociti T lesionali di pazienti con psoriasi (Pso) e dermatite atopica (AD) sono stati attivati in modo policlonale *in vitro* e valutati per l'espressione intracellulare di varie citochine mediante citofluorimetria. Nel grafico sono riportate le percentuali (media \pm deviazione standard) dei linfociti CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) esprimenti IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 o IL-8. *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

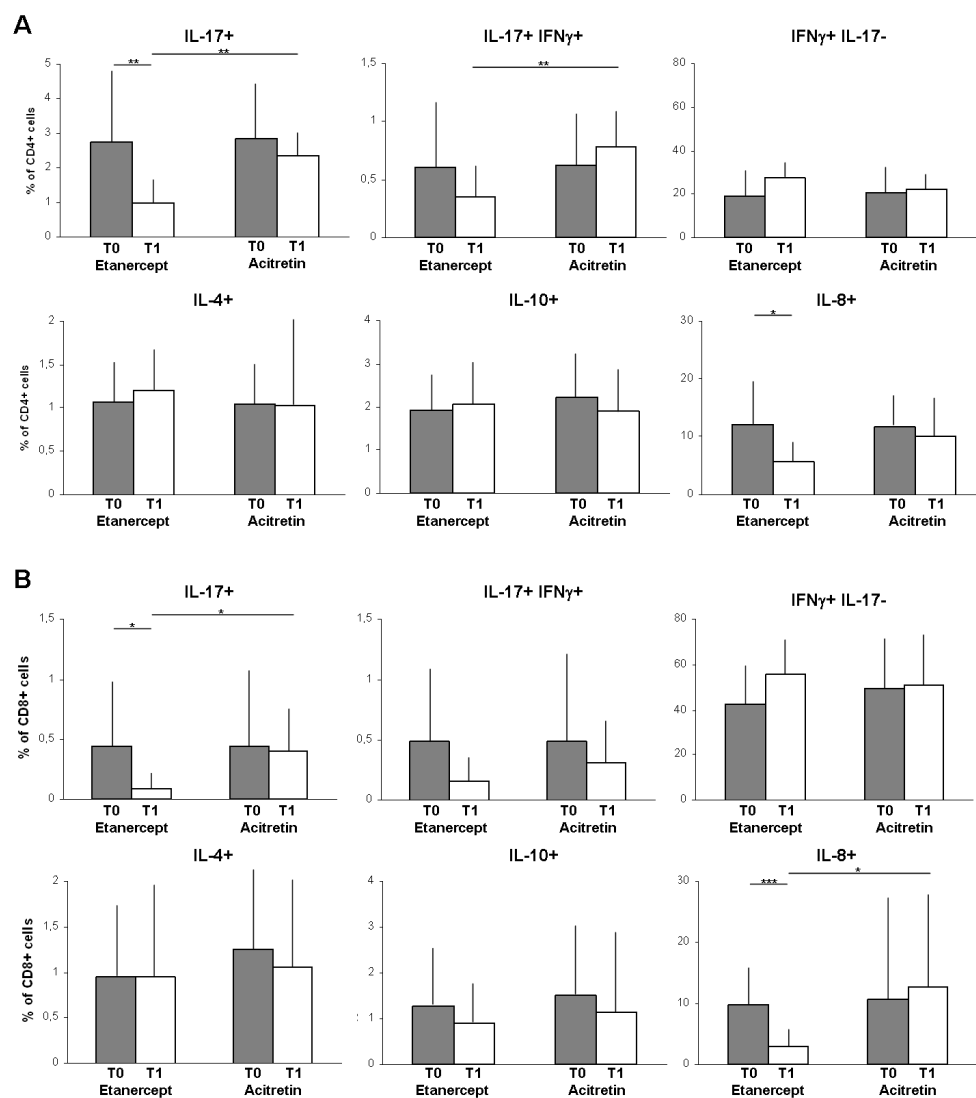


Fig. 5. Etanercept, ma non acitretina, è in grado di modificare il fenotipo dei linfociti T circolanti nei pazienti con psoriasi. I linfociti T circolanti di pazienti con psoriasi sono stati attivati in modo policlonale *in vitro* e valutati per l'espressione intracellulare di varie citochine mediante citofluorimetria prima (T0) e dopo (T1) terapia con etanercept o acitretina. Nel grafico sono riportate le percentuali (media \pm deviazione standard) dei linfociti CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) esprimenti IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 o IL-8. *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

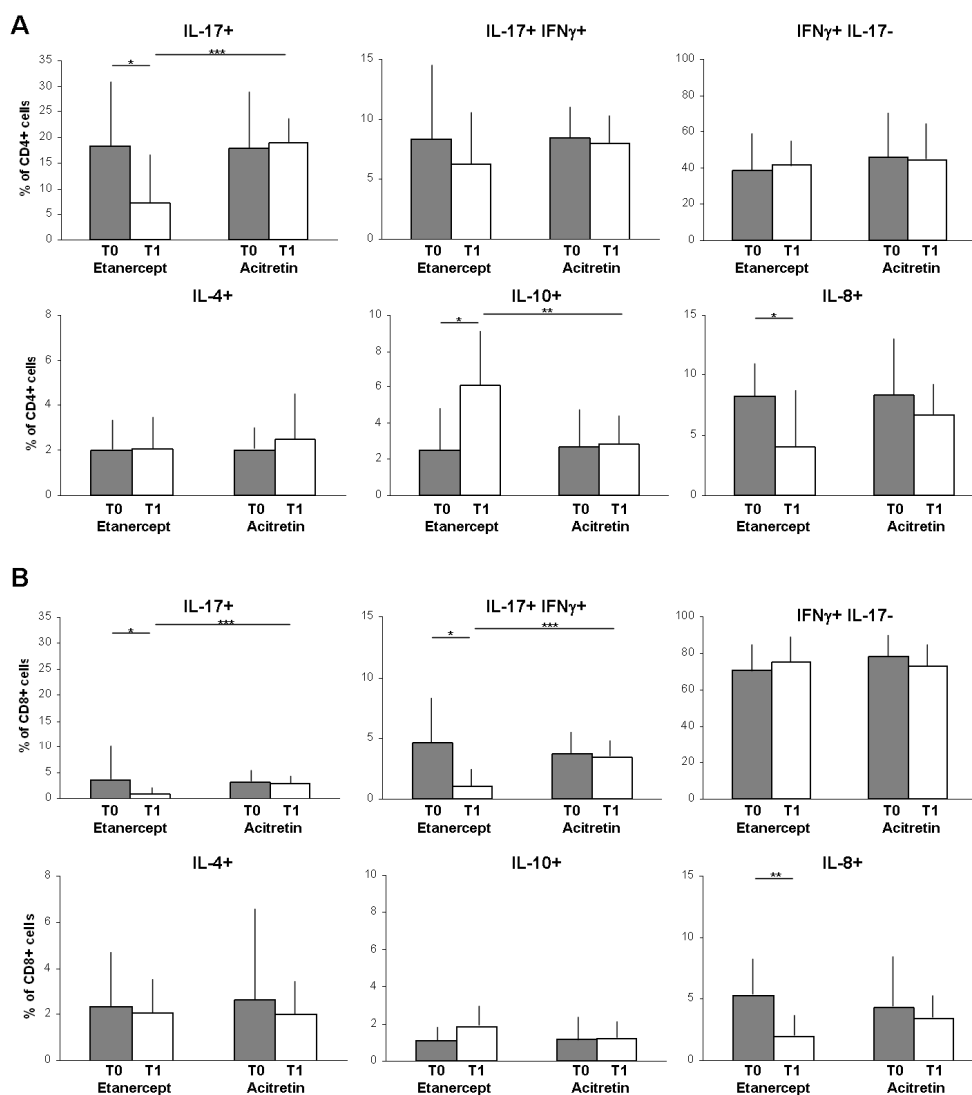


Fig. 6. Riduzione dei linfociti T IL-17- e IL-8-secrerenti nella cute di pazienti psoriasici dopo il trattamento con etanercept. I linfociti T attivati di pazienti con psoriasi sono stati isolate dalle lesioni cutanee prima (T0) e dopo (T1) terapia con etanercept o acitretina. Le cellule sono state espanse *in vitro* mediante rIL-2, attivate in modo policlonale e valutate per l'espressione intracellulare di varie citochine mediante citofluorimetria. Nel grafico sono riportate le percentuali (media \pm deviazione standard) dei linfociti CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) esprimenti IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-10 o IL-8. *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

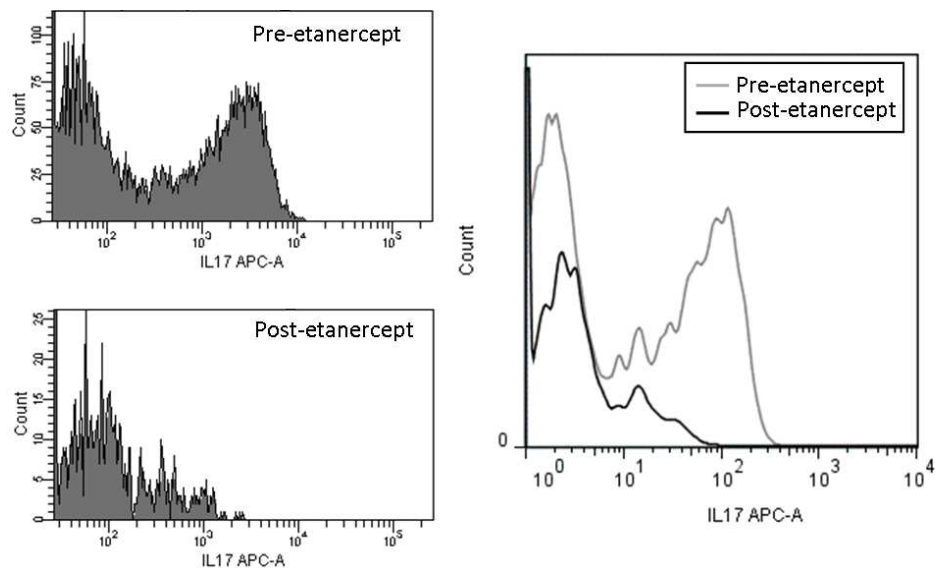


Fig. 7. Effetto di etanercept sul fenotipo dei linfociti T lesionali nella cute dei pazienti psoriasici. I linfociti T attivati di pazienti con psoriasi sono stati isolate dalle lesioni cutanee prima e dopo terapia con etanercept o acitretina. Le cellule sono state espanse *in vitro* mediante rIL-2, attivate in modo policlonale e valutate per l'espressione intracellulare di IL-17 mediante citofluorimetria. Nel grafico è riportato in istogrammi il fenotipo dei linfociti T CD4+ di un caso rappresentativo.

Ringraziamenti

Al termine di un percorso che mi ha portato, dopo la Laurea in Medicina e Chirurgia e la Specializzazione in Dermatologia e Venereologia, alla conclusione di questo Dottorato di Ricerca, le persone che hanno contribuito alla mia formazione sono talmente numerose che mi sarebbe impossibile menzionarle tutte in queste poche righe. Per questo motivo, mi limiterò a coloro che hanno dato un contributo maggiore, con particolare riferimento a questa tesi.

In primis, vorrei ringraziare il Prof. Fabbri e, subito a ruota, la Dr.ssa Caproni, che hanno svolto un ruolo determinante nel viaggio da me intrapreso ormai da più di 10 anni nel variegato mondo della Dermatologia e hanno dato idee e spunti importanti per lo svolgimento della presente tesi.

Vorrei poi ringraziare il team capeggiato dalla Prof. Parronchi e costituito inoltre dalla Dr.ssa Cardilicchia, dalla Dr.ssa Filì, dalla Dr.ssa Maggi e dalla Dr.ssa Manuelli, che hanno dato un enorme contributo per la parte sperimentale di questa ricerca.

Altro ringraziamento a chi mi ha diretto durante i tre anni del Dottorato, in particolare al Prof. Forti, che si è sempre dimostrato disponibile a chiarire i miei dubbi, e alla Prof. Massi e al Prof. Orlando, che hanno svolto il ruolo di tutor rispettivamente nella prima e nella seconda fase del Dottorato stesso.

Vorrei infine riservare un'ultima parola al Prof. Serio, prematuramente scomparso: persona straordinaria, con cui purtroppo ho avuto solo rare occasioni di confronto ma che sono bastate a lasciare in me un segno indelebile della sua notevole statura umana e scientifica.