



UNIVERSITÀ DI PISA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di laurea in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA

Fattori angiogenetici e fibrogenici
nella malattia da IgG4

RELATORE

Prof.ssa Paola Migliorini

CANDIDATO

Francesca Giusti

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

| | |
|--|----|
| 1. ABSTRACT..... | 3 |
| 2. INTRODUZIONE..... | 4 |
| 2.1 LA MALATTIA DA IgG4..... | 4 |
| 2.2 ANGIOGENESI..... | 45 |
| 2.3 FIBROSI..... | 48 |
| 2.4 ANGIOGENESI E FIBROSI NELLA IgG4-RD..... | 50 |
| 3. SCOPO DELLA TESI..... | 53 |
| 4. PAZIENTI E METODI..... | 54 |
| 4.1 PAZIENTI..... | 54 |
| 4.2 METODI..... | 54 |
| 5. RISULTATI..... | 57 |
| 6. DISCUSSIONE..... | 63 |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 66 |

1 ABSTRACT

La malattia da IgG4 (IgG4-RD) è una malattia fibro-infiammatoria ad eziologia sconosciuta riconosciuta relativamente da poco tempo che colpisce potenzialmente ogni organo. L'elevazione dei livelli sierici delle IgG4 caratterizza la maggioranza dei soggetti affetti, aiutando nel sospetto diagnostico e nella diagnosi, anche se per la diagnosi definitiva è necessaria l'istologia, accompagnata da adeguate correlazioni cliniche. La fibrosi è una caratteristica chiave della diagnosi istologica e della malattia stessa: alcuni studi hanno descritto la presenza di mediatori pro-fibrogenici come TGF- β 1 e periostina in campioni biotici di ghiandole salivari affette da IgG4-RD, ma nessuno ha finora valutato i fattori che regolano l'angiogenesi, tappa fondamentale nella fibrosi e mediatori che regolano tali processi nel circolo sistemico.

Lo scopo di questo studio è quello di valutare in pazienti con malattia da IgG4 i livelli sierici circolanti di fattori che regolano l'angiogenesi (VEGF, Ang-1, Endostatina) e la fibrosi (TGF- β 1, SDF-1) ed i livelli delle molecole di adesione solubili ICAM-1 (sICAM-1) e VCAM-1 (sVCAM-1), marcatori di disregolazione endoteliale, correlando i risultati ottenuti con i principali parametri sierologici e clinici della malattia.

Abbiamo studiato 15 pazienti affetti da IgG4-RD reclutati presso U.O. di Immuno-Allergologia. Nel siero di tali pazienti abbiamo dosato con metodica immunoenzimatica VEGF, Ang-1, Endostatina, TGF- β 1, SDF-1, sICAM-1 e sVCAM-1 e ne abbiamo confrontato i livelli con quelli dei sieri di soggetti sani.

Nel nostro studio, i pazienti con IgG4-RD presentavano, tra i fattori angiogenici, livelli di VEGF e di Ang-1 sovrapponibili a quelli dei soggetti sani, mentre i livelli del fattore angiostatico Endostatina erano significativamente aumentati rispetto ai controlli. Tra i fattori fibrogenici i livelli di SDF-1, ma non TGF- β 1 sono risultati significativamente aumentati rispetto al gruppo di controllo. I livelli sierici di sICAM-1, ma non sVCAM-1 sono risultati significativamente aumentati tra i pazienti con IgG4-RD rispetto ai pazienti sani. Dal nostro studio si evince che non solo a livello del tessuto d'organo interessato dalla malattia, ma anche in circolo è presente una disregolazione dei fattori che regolano l'angiogenesi e la fibrosi.

2 INTRODUZIONE

2.1 LA MALATTIA DA IgG4

La malattia da IgG4 (IgG4-RD) è una condizione fibroinfiammatoria ad eziologia sconosciuta che può colpire fundamentalmente ogni organo. I più colpiti sono le ghiandole salivari maggiori, i tessuti orbitari e periorbitari, il retroperitoneo, il pancreas, i linfonodi. La principale caratteristica clinica è la formazione di tumefazioni, mentre quelle istologiche sono un infiltrato infiammatorio ricco di plasmacellule IgG4⁺, fibrosi storiforme e flebite obliterante, che si riscontrano in modo simile in tutti gli organi colpiti. Il riscontro di livelli elevati di IgG4 nel siero dei pazienti affetti avviene molto spesso, ma non sempre [1].

Questa patologia è stata riconosciuta come condizione sistemica solo nel 2003, quando sono state osservate lesioni extrapancreatiche in soggetti affetti da pancreatite autoimmune. Molte condizioni mediche viste a lungo come confinate a un singolo organo, sono adesso parte dello spettro della IgG4-RD [2].

Per quanto riguarda la patogenesi della malattia, rimangono diversi aspetti da approfondire. Sicuramente, dal momento in cui la condizione è stata riconosciuta, il ruolo delle IgG4 è stato ridimensionato: nonostante sia plausibile che le IgG4 giochino un ruolo importante nel procurare il danno tissutale, è ormai ritenuto improbabile che siano l'elemento alla base della patogenesi. Recenti studi mostrano come i linfociti B e i plasmablasti, i linfociti T e le interazioni tra queste popolazioni cellulari, siano, invece, centrali nello stimolare i processi infiammatorio e fibrotico [1].

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Ci sono pochi studi sull'incidenza e la prevalenza globali della IgG4-RD e quelli esistenti sono stati condotti prevalentemente in Giappone e si concentrano sulla pancreatite autoimmune (AIP). La prevalenza stimata di AIP è di 0,8 casi ogni 100.000 persone in Giappone. In uno studio della Mayo Clinic, analizzando 245 pancreas provenienti da pazienti sottoposti a resezioni per patologie benigne, la pancreatite autoimmune è stata trovata nell'11% dei casi. Si può, quindi, pensare che

le difficoltà nella diagnosi e la mancanza di familiarità con la IgG4-RD portino ad una sottostima della sua prevalenza.

Nonostante i pochi studi epidemiologici riguardo alla IgG4-RD, alcune caratteristiche sono evidenti. La maggioranza dei pazienti affetti sono maschi (62%-83%) e hanno un'età medio-avanzata (>50 anni). Studi condotti in Giappone suggeriscono un rapporto tra i due sessi di 2,8:1 a favore dei maschi, con addirittura il 90% di prevalenza nel sesso maschile per le IgG4-RD che coinvolgono reni e retroperitoneo. Questo contrasta con i dati riguardanti le altre malattie autoimmuni con interessamenti d'organo simili, come ad esempio la sindrome di Sjogren o la cirrosi biliare primitiva, dove le donne sono nettamente più colpite [2]. Uno studio del 2016 ha analizzato i dati riguardanti 6 coorti (450 pazienti in totale) provenienti da Giappone, USA, Cina, Spagna, Italia e Francia, che conferma la prevalenza nel sesso maschile e l'età media d'esordio nella sesta decade, con un range molto ampio (12-86 anni). [3]

La popolazione asiatica, in particolare giapponese, risulta essere la più colpita. Seguono Europa e Nord America (Fig.1) [4].

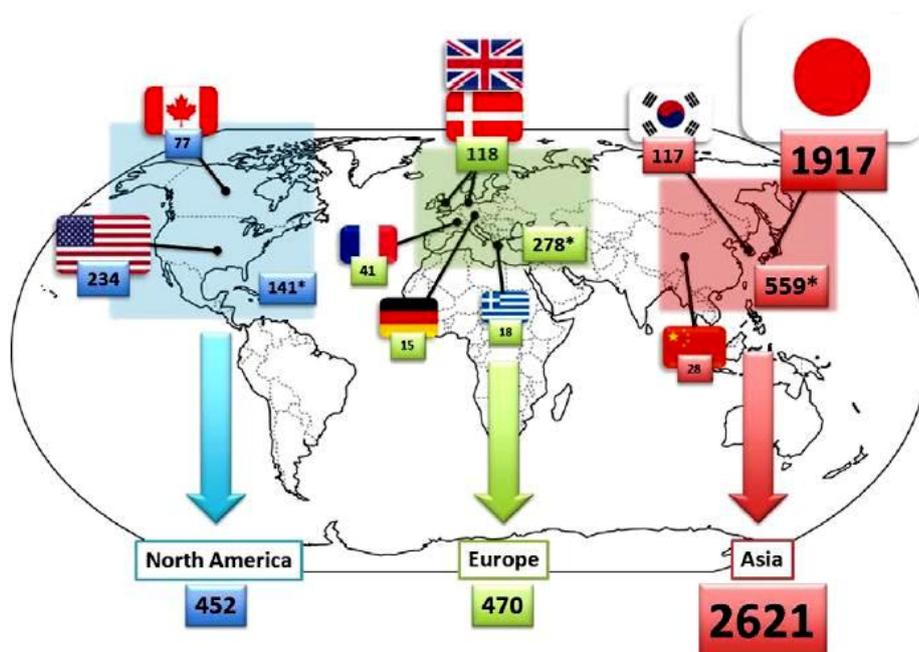


Figura 1 Distribuzione dei casi diagnosticati di IgG4-RD nel mondo [4]

2.1.2 EZIOPATOGENESI

2.1.2.1 FATTORI GENETICI

Non è nota una chiara associazione genetica, né sono stati riportati casi familiari di malattia. Tra i diversi fattori genetici di suscettibilità per la IgG4-RD, ne sono stati individuati alcuni che sembrano essere più importanti. In un piccolo studio su pazienti giapponesi affetti da AIP di tipo 1 (pancreatite IgG4-relata), è stato individuato un possibile link con HLA (DRB1*0405 e DQB1*0401), ma anche con un polimorfismo di NF- κ B, con il gene del FcRL3, espresso dai linfociti B, con KCNA-3, gene che codifica per un canale del potassio voltaggio-dipendente e, infine, con CTLA-4, espresso dai linfociti T di memoria e dai linfociti T regolatori.

Sono state individuate anomalie nell'immunità innata dei pazienti affetti da IgG4-RD: l'attivazione di NOD-2 e i ligandi dei TLR espressi su monociti e basofili aumentano la risposta IgG4 tramite BAFF e IL-13, nonostante l'agente patogeno scatenante rimanga sconosciuto [5].

2.1.2.2 ANTICORPI

Esiste un'ampia omologia tra l'anidrasi carbonica umana II (CA-II) e l'anidrasi carbonica di *H. pylori*. I segmenti omologhi contengono il motivo legante HLA DRB1*0405. Anche la proteina legante il plasminogeno di *H. pylori* è molto simile alla componente n-recognin 2 dell'ubiquitina-proteina ligasi E3 (gene UBR2), espressa dalle cellule acinari pancreatiche. La maggior parte dei pazienti con pancreatite IgG4-relata sono positivi per gli anticorpi contro la proteina legante il plasminogeno di *H. pylori*. In teoria, a causa del mimetismo molecolare, questi anticorpi possono comportarsi come autoanticorpi, in soggetti geneticamente predisposti [2]. Altri autoantigeni riconosciuti sono la lattoferrina (LF) e l'inibitore secretorio della tripsina (PSTI), distribuiti in pancreas, vie biliari, ghiandole salivari e in molti altri organi. In modelli murini, si sviluppano pancreatiti, colangiti, nefriti interstiziali o sialoadeniti simili a quelle della IgG4-RD, tramite immunizzazione con CA-II e LF [5].

Analisi ultrastrutturali hanno dimostrato depositi granulari elettrondensi a livello della membrana basale dei tubuli renali e dei dotti pancreatici in pazienti con IgG4-RD. Questi depositi sono costituiti principalmente da IgG4 e C3, ma sono presenti anche IgG1, IgG2 e IgG3 [2].

2.1.2.3 IgG4

Le IgG4 sono anticorpi unici sia nella struttura che nella funzione. Rappresentando meno del 5% delle IgG nelle persone sane, sono la sottoclasse di IgG meno abbondante. La sua concentrazione normale oscilla tra 0,01 e 1,4 mg/ml, un range amplissimo considerando che il limite inferiore è oltre 100 volte minore rispetto al superiore; nel singolo individuo, comunque, tende ad essere stabile nel tempo. Nonostante esista oltre il 95% di omologia tra i domini della regione costante delle IgG4 e quelli delle altre IgG, le differenze di sequenza aminoacidica nel secondo dominio della regione costante riducono la capacità delle IgG4 di legare sia il C1q, sia il Fc γ R. Quindi, le IgG4 non sono in grado di attivare la via classica del complemento [2]. L'incapacità di legare Fc γ R e C1q, rende le IgG4 incapaci di attivare i fagociti, la citotossicità anticorpo-dipendente e il danno mediato dal complemento.

Le IgG4 sono prodotte tipicamente nella risposta agli allergeni alimentari e ambientali; prima di ottenere titoli significativi di IgG4, è necessaria un'esposizione di lunga durata. La risoluzione delle allergie infantili sono accompagnate da un cambio nel profilo anticorpale anti-allergeni dalle IgE alle IgG4. La produzione di IgG4 è stimolata anche dai trattamenti desensibilizzanti attuati in diverse malattie allergiche. In questi contesti, le IgG4 svolgono un ruolo protettivo dagli allergeni bloccando e sequestrando gli allergeni, prevenendo il contatto con le IgE localizzate sulla superficie dei mastociti [6].

Una caratteristica unica delle IgG4 è la reazione di scambio di metà anticorpo, detta anche Fab-arm exchange. Le IgG4 formano facilmente legami disolfuro nella loro regione cerniera, ma questi legami sono instabili [2]. La differenza di un singolo amminoacido nella regione cerniera (una serina al posto della prolina presente nelle IgG1), causa difficoltà nella formazione dei ponti disolfuro [6]. Per questo, in vitro, circa il 50% delle IgG4 presenta forze non covalenti a tenere unite le sue catene

pesanti. In vivo, questa percentuale può variare in base a fattori locali, come il pH, ad esempio [2]. Come risultato di questa instabilità, questi anticorpi possono andare incontro al Fab-arm exchange, dove metà di una IgG4, costituita da una catena pesante e da una leggera legate covalentemente, si associa con un'altra metà, avente specificità diversa (Fig. 2, a). Si formano, così anticorpi potenzialmente bispecifici che, però, sono funzionalmente monovalenti. Questi anticorpi non sono in grado di formare immunocomplessi, proprio perché non possono formare cross-link con gli antigeni.

In alcune circostanze, IgG4 agisce come fattore reumatoide, e lega la porzione Fc delle IgG, in particolare delle IgG4.

Tutte queste caratteristiche esclusive delle IgG4, rendono ragione della diffusa visione di questi anticorpi come antiinfiammatori [2].

2.1.2.3.1 IgG4: RUOLO IN ALCUNE PATOLOGIE

Nonostante le IgG4 siano tradizionalmente viste come anticorpi antiinfiammatori, queste Ig giocano un ruolo centrale in alcune patologie immunomediate. Il pemfigo volgare e il pemfigo foliaceo sono caratterizzati dalla presenza di autoanticorpi contro la desmogleina, principalmente costituiti da IgG4. In più, anche gli autoanticorpi diretti contro la fosfolipasi A2 di tipo M presente nei podociti, che causano la glomerulonefrite membranosa idiopatica, sono per la maggior parte IgG4. Infine, le IgG4 anti-ADAMTS13 sembrano essere le principali responsabili della porpora trombotica trombocitopenica.

2.1.2.3.2 IgG4: RUOLO NELLA IgG4-RD

La riduzione dei livelli circolanti di C3 e C4 è osservata comunemente nella IgG4-RD, nonostante le IgG4 non attivino direttamente il complemento. In più, si ritrovano depositi di C3 e IgG4 lungo la membrana basale sia nella AIP, sia nella TIN IgG4-related. L'ipocomplementemia è particolarmente comune, tra il 50% e il 70% tra i pazienti con TIN IgG4-relata. Questo reperto è frequente nelle malattie con deposito di immunocomplessi e potrebbe, quindi, supportare l'idea che le IgG4 abbiano un ruolo in questo senso: ciò appare in contraddizione con l'incapacità di fissare il

complemento. La fissazione del complemento potrebbe avvenire grazie ad altre sottoclassi, come le IgG1, elevate nella IgG4-RD; oppure grazie all'attivazione delle vie alternativa e lectinica del complemento, da parte degli immuno-complessi formati da IgG4. È possibile, perciò, che le IgG4 abbiano un limitato potere proinfiammatorio e che gli immunocomplessi da esse formati riducano la risposta infiammatoria e la risposta dei linfociti B.

La natura degli immunocomplessi che si formano in vivo nella IgG4-RD rimane sconosciuta. Si ipotizzano due meccanismi. A causa del Fab-arm exchange tra anticorpi con specificità per antigeni diversi, possono risultare anticorpi funzionalmente monovalenti, con la conseguente formazione di immunocomplessi piccoli che non precipitano. Nel caso in cui le due braccia dell'anticorpo formatosi con il Fab-arm exchange fossero, invece, specifiche per due diversi epitopi dello stesso antigene, potrebbero formarsi immunocomplessi di grandi dimensioni. Questi immunocomplessi vengono difficilmente rimossi a causa della mancanza di legame da parte del complemento, spiegando così i depositi di IgG4 ritrovati in alcuni casi di IgG4-RD (Fig.2, b) [6].

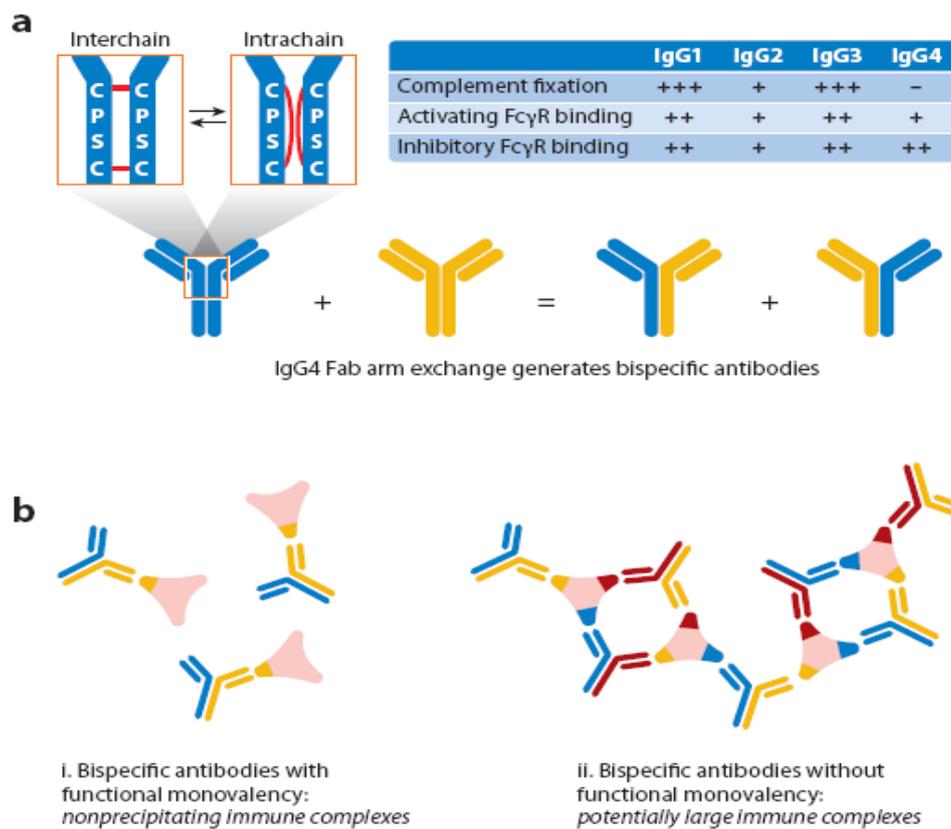


Figura 2 a. Caratteristiche delle sottoclassi di IgG e Fab-arm exchange; b. Formazione di immunocomplessi dopo Fab-arm exchange. [6]

2.1.2.4 CELLULE T

La visione classica della IgG4-RD è quella in cui la risposta T cellulare nei tessuti affetti sia polarizzata nella direzione dei Th2: l'espressione degli mRNA delle citochine caratteristiche come IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 risulta più elevato rispetto alle altre condizioni autoimmuni. Questo spiega, inoltre, gli elevati livelli di IgE e eosinofili presenti in circa il 40% dei pazienti con IgG4-RD e l'importante produzione di IgG4, dato che le citochine della risposta Th2 causano lo shift isotipico verso IgE e IgG4[2]. Tuttavia, nuove evidenze dimostrano come la prevalenza di Th2 nella IgG4-RD non sia presente nei soggetti non atopici. [7]

Un'altra caratteristica peculiare è l'attivazione delle cellule T regolatorie (Treg). Questo contrasta con le altre malattie autoimmuni, dove queste cellule sono ridotte. L'attivazione delle Treg è dimostrata sia dai livelli di mRNA codificante FOXP3 nei tessuti, sia dagli infiltrati di queste cellule CD4+CD25+. Le Treg producono IL-10 (come i Th2), ma anche TGF- β , che risulta iperespresso in questa patologia. TGF- β svolge un ruolo chiave nella formazione di tessuto fibrotico. La fibrosi è causata anche dalla produzione prolungata di IL-13, che attiva i fibroblasti e la deposizione di matrice [6] (Fig.3).

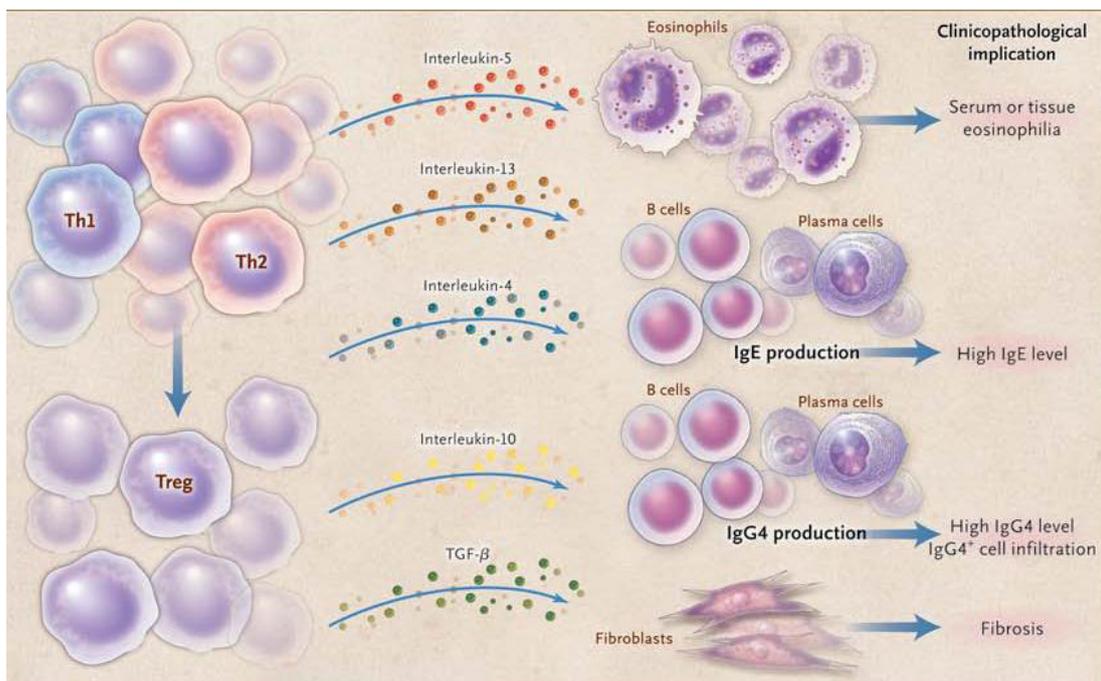


Figura 3 Cellule, citochine e implicazioni clinico-patologiche in IgG4-RD [2]

Studi recenti suggeriscono che le cellule T giochino un ruolo fondamentale nella patogenesi della IgG4-RD. Sono la popolazione più abbondante nei tessuti colpiti. Sono state individuate delle cellule T CD4+ citotossiche (CTL) in alte concentrazioni sia nel sangue periferico che nelle lesioni, dove rappresentano la popolazione cellulare CD4+ dominante: questo fa pensare che abbiano un ruolo centrale. Queste cellule producono interleuchine come TGF- β 1, IL-1 β e IFN- γ [7], ma anche il granzima B e la perforina, solitamente associate alle cellule T CD8+ [1]. La concentrazione sierica dei CTL CD4+ SLAMF7+ cala drasticamente in seguito a terapie che riducono le cellule B (Rituximab), nonostante CTL CD4+ non esprimano CD20 sulla loro superficie [7]. L'ipotesi più plausibile è che queste cellule sopravvivano grazie alla continua presentazione dell'antigene operata dalle cellule B. L'interazione tra cellule B e T sembra, quindi, un punto chiave dove interferire con la terapia. Con plasmablasti e cellule B, CTL CD4+ sono probabilmente i principali responsabili del danno d'organo e della fibrosi: l'IFN- γ prodotto da queste cellule può contribuire ad attivare i macrofagi, promuovendo la fibrosi. Infatti, i macrofagi e i fibroblasti stimolati, producono una densa fibrosi con pattern storiforme [1].

2.1.2.5 CELLULE B

Sia le cellule B che i plasmablasti hanno funzioni fondamentali nella patogenesi della IgG4-RD, la più importante delle quali sembra essere la presentazione dell'antigene alle cellule T. I plasmablasti si ritrovano, infatti, in alte concentrazioni nel sangue, a prescindere da quelle di IgG4. I plasmablasti circolanti mostrano un'intensa ipermutazione somatica, che testimonia l'interazione con le cellule T nei centri germinativi dei linfonodi [1].

Come già descritto, la riduzione del numero di cellule B provoca la riduzione del numero di cellule T e, quindi, inibisce molti dei processi patologici che provocano la IgG4-RD (Fig. 4).

2.1.2.6 MACROFAGI

Macrofagi attivati sono stati dimostrati sia in biopsie di ghiandole salivari affette da malattia di Mikulicz, suggerendo un ruolo diretto di queste cellule nella fibrogenesi

nella malattia a IgG4. D'altronde, è noto che i macrofagi siano coinvolti in angiogenesi, immunomodulazione, guarigione delle ferite e fibrosi, dato che producono PDGF e TGF- β . Inoltre, è stato dimostrato che i macrofagi di pazienti con IgG4-RD stimolano i linfociti B a produrre IgG4, se stimolati con TLRs e recettori NOD-like. La produzione di IgG4 dipende dalla secrezione di BAFF da parte di monociti attivati [8].

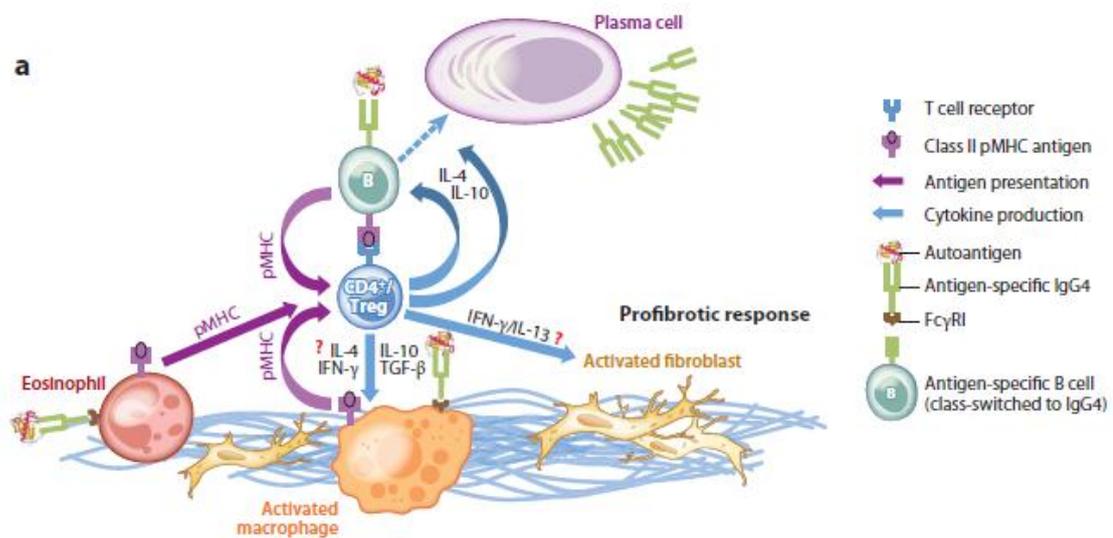


Figura 4 Interazioni tra le cellule coinvolte nella patogenesi della IgG4-RD [6]

2.1.3 CLINICA

I pazienti affetti da IgG-RD, solitamente, hanno una storia clinica non rilevante. L'unica caratteristica che si riscontra frequentemente, fino al 40% dei soggetti, è una lunga storia di manifestazioni allergiche: atopia, riniti, sinusiti, asma ed eczema [2].

Tipicamente, IgG4-RD giunge all'attenzione del medico per l'interessamento di un singolo organo e i sintomi ad esso correlati. Solo una minoranza dei pazienti ha perdita di peso, febbre, manifestazioni di infiammazione sistemica e innalzamento dei reattanti di fase acuta.

Possono esserci miglioramenti spontanei, ma più frequentemente la malattia progredisce in modo lento e indolente [6].

I segni e i sintomi alla presentazione sono molto variabili e possono essere distinti in sistemici e organo-specifici.

2.1.3.1 SEGNI E SINTOMI SISTEMICI

La maggior parte delle IgG4-RD esordiscono in modo subacuto. Alcuni pazienti hanno un calo ponderale anche importante, ma piuttosto lento, che porta il soggetto a rendersi conto della situazione solo dopo settimane o mesi. Le principali manifestazioni sistemiche sono astenia (26%), perdita di peso (21%) e febbre (8%), poco frequenti e aspecifiche.

2.1.3.2 SEGNI E SINTOMI ORGANO-SPECIFICI

La caratteristica tipica della malattia è la presenza di tumefazioni, che vengono spesso scambiate per neoplasie. In circa il 40% dei soggetti affetti, è coinvolto un singolo organo al momento della prima valutazione. I sintomi organo-specifici riscontrati sono stati: dolore addominale (40%), sindrome secca (15%), sintomi respiratori (13%), prurito (13%) e diarrea (7%). Altre manifestazioni, che indagate più a fondo hanno portato direttamente alla diagnosi, sono state: ingrossamento delle ghiandole salivari (42%), linfadenopatie (42%), ingrossamento delle ghiandole lacrimali (26%), ittero (23%), epatomegalia (6%) e splenomegalia (4%). La maggioranza delle masse che si formano ha un atteggiamento indolente, ma in alcuni casi è stata riportata distruzione locale dei tessuti, inclusa l'erosione ossea.

La malattia multiorgano è, a volte, più semplice da riconoscere perché il paziente appare più debilitato, ma spesso il quadro multiorgano è l'evoluzione di coinvolgimenti metacroni, aggiuntisi uno alla volta nel corso di mesi o anche anni [9].

2.1.3.3 INTERESSAMENTO D'ORGANO

Gli organi più frequentemente coinvolti nella IgG4-RD sono le ghiandole salivari, in particolare le sottomandibolari, e il pancreas. Seguono ghiandole lacrimali, linfonodi, vie biliari e colecisti, retroperitoneo, tiroide, reni, polmoni, occhio e tessuti perioculari, aorta, fegato. Molti altri organi possono essere colpiti, ma con frequenza molto inferiore: ipofisi, meningi, prostata, mammella, cute, pericardio, valvola aortica [10], vie aeree superiori, orecchio, pericardio, pleura, mediastino, regione paraspinale, nervi periferici (Fig.5) [6].

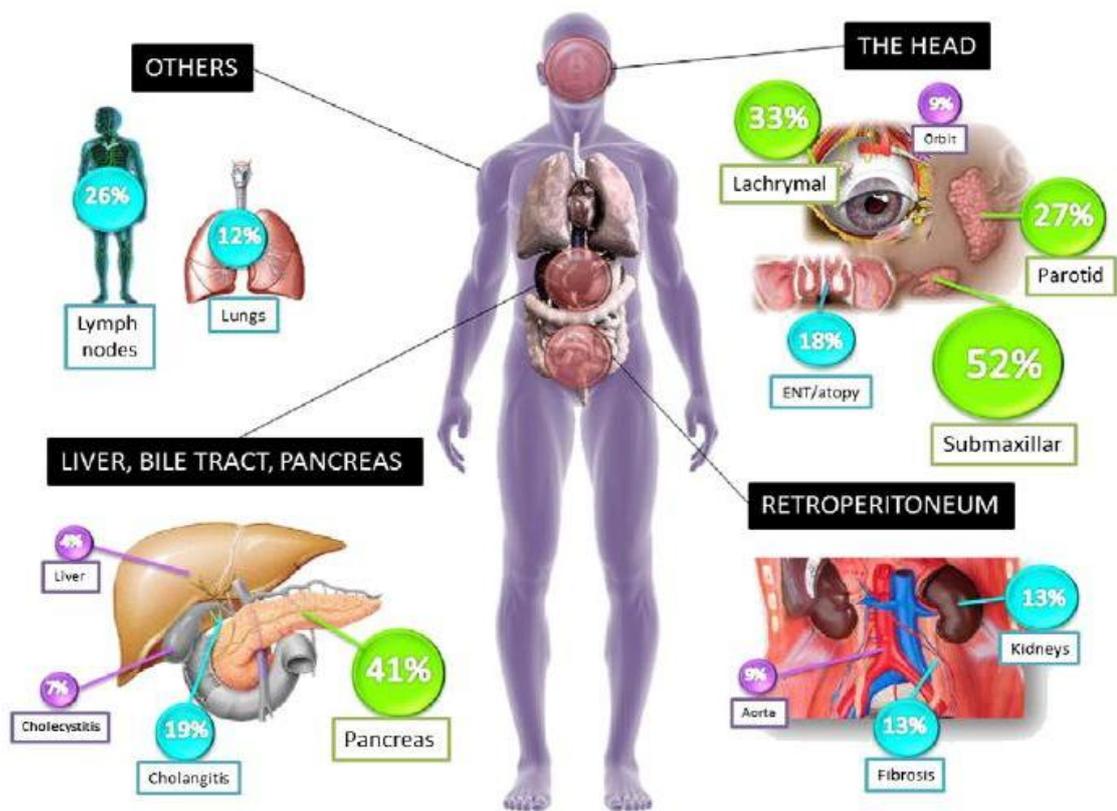


Figura 5 Frequenza dell'interessamento d'organo nella IgG4-RD [4]

2.1.3.3.1 GHIANDOLE SALIVARI

La sialoadenite IgG4-relata può colpire le ghiandole sottolinguali, sottomandibolari e parotidiche [6]. Tuttavia, colpisce più frequentemente le ghiandole sottomandibolari, spesso senza interessamento parotideo. Nella sindrome di Sjogren abbiamo il quadro opposto: l'ingrossamento delle ghiandole sottomandibolari non associato a quello parotideo avviene molto raramente. Nella IgG4-RD, tuttavia, l'interessamento delle ghiandole parotidiche è possibile e può essere ben evidente (Fig.6). Il coinvolgimento delle ghiandole salivari è caratterizzato da una tumefazione nodulare di consistenza dura,

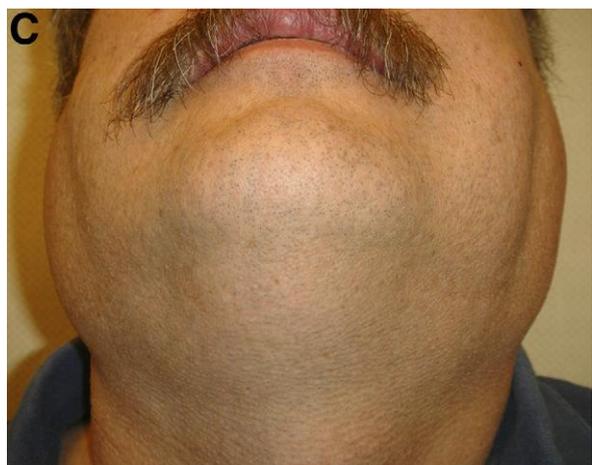


Figura 6 Tumefazione parotidea bilaterale in uomo affetto da IgG4-RD [6]

molto raramente. Nella IgG4-RD, tuttavia, l'interessamento delle ghiandole parotidiche è possibile e può essere ben evidente (Fig.6). Il coinvolgimento delle ghiandole salivari è caratterizzato da una tumefazione nodulare di consistenza dura,

generalmente simmetrica ed è associato a dolore, dolorabilità e riduzione della produzione di saliva. La malattia di Mikulicz è stata descritta nel 1892 e include la triade: tumefazioni delle ghiandole parotidiche, sottomandibolari e lacrimali. La natura di questa condizione è rimasta incerta fin dalla sua descrizione; per decenni è stata considerata una variante della sindrome di Sjogren e, tuttora, accade continuamente che la IgG4-RD sia misdiagnosticata come sindrome di Sjogren. Ricerche giapponesi, invece, hanno ormai dimostrato che molti pazienti riconosciuti come affetti da malattia di Mikulicz, in realtà, hanno la IgG4-RD. La diagnosi differenziale tra la sindrome di Sjogren e la IgG4-RD si fa sulla base di reperti clinici, sierologici e istologici. Sarebbe opportuno, quindi, sostituire la denominazione “Malattia di Mikulicz” con le più appropriate “Sialoadenite IgG4-relata” e “Dacrioadenite IgG4-relata”. Un'altra patologia descritta alla fine del 1800 è il cosiddetto “tumore di Küttner”, caratterizzato dall'ingrossamento bilaterale delle ghiandole sottomandibolari. Anche in questo caso, è dimostrato che l'ingrossamento bilaterale delle ghiandole sottomandibolari in assenza di calcoli salivari nel dotto di Wharton è frequentemente associato alla IgG4-RD (Fig.7). Dunque,



Figura 7 Tumefazione bilaterale delle ghiandole sottomandibolari in donna affetta da IgG4-RD [6]

“tumore di Küttner” dovrebbe essere riservato alle tumefazioni bilaterali sottomandibolari associate a sialoliti o infezioni. Anche le ghiandole salivari minori delle labbra possono essere colpite, com'è dimostrabile tramite biopsia, anche quando la mucosa orale appare macroscopicamente normale [11].

2.1.3.3.2 PANCREAS

La denominazione “pancreatite autoimmune” (AIP) è stata scelta per indicare un disordine infiammatorio del pancreas, ma le evidenze di un reale processo autoimmunitario, anziché di un'inflammatione immuno-mediata, sono scarse. Ci sono due diverse condizioni incluse nella AIP: il tipo 1, prototipo della IgG4-RD e il

tipo 2. La AIP di tipo 1 presenta tutte le caratteristiche istologiche classiche della IgG4-RD: infiltrato linfoplasmacitoide IgG4⁺, fibrosi storiforme e flebite obliterante. La sintomatologia della AIP differisce dalle altre pancreatiti, comprendendo ittero ostruttivo, perdita di peso e dolore addominale lieve-moderato [11]. Una minoranza dei pazienti si presenta con intolleranza acuta al glucosio, mentre un'altra piccola percentuale ha le caratteristiche cliniche e sierologiche sia della pancreatite acuta (dolore addominale severo e elevazione della lipasi), sia della pancreatite cronica (insufficienza pancreatica esocrina, calcificazioni, pseudocisti). Il dotto pancreatico è diffusamente stenotico. Col tempo, l'organo si atrofizza. All'imaging possiamo avere un ingrossamento diffuso "a salsiccia" o un ingrossamento focale, con perdita del normale aspetto lobulare. Quando abbiamo la formazione di una massa, associata alla presentazione clinica, la pancreatite IgG4-relata è spesso erroneamente diagnosticata come neoplasia pancreatica [6]. Per questo, un gran numero di pazienti è andato incontro all'intervento chirurgico, a seguito del quale l'anatomia patologica dimostrava, invece, la presenza di una lesione benigna. Tuttavia, quando le indagini radiologiche sono equivocate, la diagnosi viene fatta dopo l'asportazione. Tuttavia, la maggioranza delle diagnosi avviene grazie al sospetto clinico e radiologico e alla conferma biotipica. Anche la presenza di linfadenopatie satelliti non aiuta nella diagnosi differenziale con le lesioni maligne, perché anche nell'80% delle AIP sono presenti [11].

2.1.3.3.3 OCCHIO E TESSUTI PERIOCULARI

La IgG4-RD può causare infiammazione orbitaria e costituisce il 25% della diagnosi differenziale, in cui bisogna considerare il linfoma, l'oftalmopatia di Graves, la sindrome di Wegener (granulomatosi con poliangite) e altre. Il termine "idiopatico" deve essere riservato alle infiammazioni orbitarie e periorbitarie che rimangono escluse dai quadri sopracitati, inclusa la IgG4-RD.



Figura 8 Ingrossamento della ghiandola lacrimale in uomo di 56 aa affetto da IgG4-RD [6]

Le strutture che possono essere affette sono le ghiandole lacrimali (Fig. 8), il condotto naso-lacrimale e la regione retrobulbare, inclusi i muscoli extraoculari (ad esempio, miosite orbitaria) e lo pseudotumor orbitario [11].



Figura 9 Proptosi e exotropia dell'occhio sinistro in uomo di 62 aa, causate da pseudotumore orbitario IgG4-relato [6]

L'interessamento della regione retrobulbare può portare a proptosi di vario grado, talvolta drammatiche (Fig. 9). In alcuni pazienti la malattia si estende nella fossa pterigopalatina e può infiltrare lungo il corso del nervo trigemino, mimando un atteggiamento maligno. Altre manifestazione includono dacriocistite e ispessimento asintomatico dei muscoli extraoculari [6]. È, quindi, più corretto parlare di “malattia oftalmica IgG4-relata”, anziché “malattia orbitaria IgG4-relata” [11].

2.1.3.3.4 TIROIDE

La tiroidite di Riedel è stata identificata come una manifestazione della IgG4-RD [11]. L'associazione della tiroidite di Riedel con la fibrosi sistemica multifocale era già stata riconosciuta negli anni '60, ma solo nel 2009 è stato stabilito il legame tra la IgG4-RD e questa tiroidite. L'ingrossamento della ghiandola può portare a disfonia, disfagia, dolore cervicale e dispnea. Col tempo, la ghiandola diventa sempre più grande sclerotica e può estendersi ai tessuti adiacenti, mettendo a rischio le strutture della regione anteriore del collo [6]. Biopsie tiroidee in fase precoce di malattia, mostrano le caratteristiche istologiche tipiche, ma quelle eseguite su pazienti con patologia più avanzata mostrano, semplicemente, fibrosi. La tiroidite di Riedel è rara, per cui sono necessari ulteriori studi, possibilmente in vari stadi della malattia, per determinare in quale percentuale la tiroidite di Riedel sia attribuibile alla IgG4-RD. Anche la variante fibrosante della tiroidite di Hashimoto sembra essere parte della IgG4-RD. È stata, inoltre, avanzata l'ipotesi che la tiroidite di Hashimoto, distinta dalla sua variante fibrosante, possa cadere nel quadro della IgG4-RD, ma la maggioranza degli esperti rifiuta questa teoria [11].

2.1.3.3.5 LINFONODI

L'interessamento linfonodale nella IgG4-RD può avere due aspetti: il coinvolgimento dei linfonodi locoregionali, drenanti un organo interessato dalla patologia (molto comune nella pancreatite IgG4-relata, ad esempio) oppure la linfadenopatia generalizzata, che può essere la sola manifestazione della malattia. Il quadro di linfadenopatia generalizzata è accompagnato da ipergammaglobulinemia, elevati livelli delle IgG4 e, a volte, anche delle IgE, ma i pazienti sono tipicamente asintomatici. Questi pazienti spesso vanno incontro a biopsie per escludere linfomi, sarcoidosi, malattia di Castleman multicentrica e neoplasia metastatica [11]. I linfonodi colpiti hanno dimensioni colpite tra 1 e 3 centimetri e possono essere localizzati in sede cervicale, sopraclaveare, sottomandibolare, ascellare, ilare, mediastinica, paraaortica, retroperitoneale e inguinale [6]. L'istologia dei linfonodi colpiti da IgG4-RD è variabile: la caratteristica fibrosi storiforme è rara, mentre riscontriamo un aumentato numero di plasmacellule IgG4⁺. La diagnosi di IgG4-RD è raramente presa in considerazione, per cui la colorazione con IgG4 non viene fatta. Nella maggior parte dei casi, il referto dell'anatomopatologo indica, quindi, un quadro di iperplasia follicolare di tipo reattivo [11].

2.1.3.3.6 POLMONE

Sono stati descritti sei pattern principali di coinvolgimento polmonare, in base a istologia e imaging: noduli; ispessimento della trama bronco vasale (Fig. 10); malattia alveolare interstiziale con honeycombing, bronchiectasie e opacità "ground-glass" diffuse; opacità "ground-glass" isolate; ispessimento marcato delle

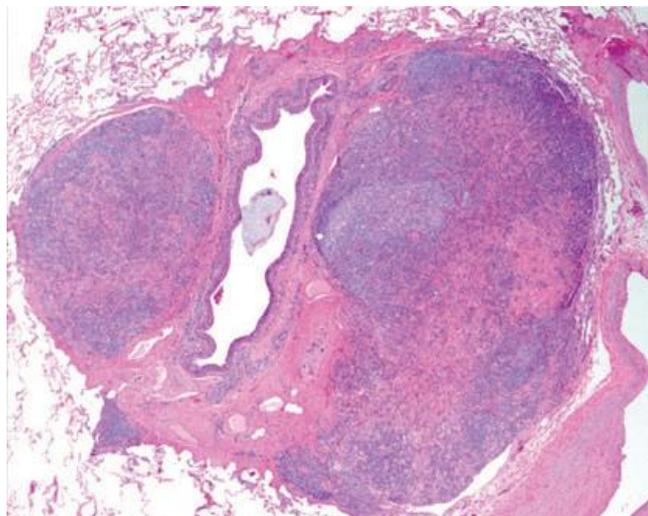


Figura 10 Ispessimento della trama broncovasale IgG4-RD: istologia che mostra noduli adiacenti ad un bronco [6]

pleure, sia viscerale che parietale, con infiammazione sclerosante diffusa; lesioni stenose delle vie aeree. Alcuni pazienti sono asintomatici e scoprono la malattia incidentalmente, tramite imaging svolti per altri motivi. A volte, invece, i pazienti presentano tosse, emottisi, dispnea, versamenti pleurici o dolore toracico. L'aspetto del quadro polmonare IgG4-RD può mimare molte altre patologie primitive del polmone, come neoplasie solide, linfomi, sindrome di Wegener, sarcoidosi, malattia di Castleman multicentrica, processi infettivi e granulomatosi linfomatoide [11]. Il quadro istologico del polmone differisce in due aspetti dagli altri organi: l'arterite obliterante si riscontra più frequentemente, accompagnata dalla flebite, così come gli infiltrati neutrofilici, solitamente assenti in altre sedi [6].

2.1.3.3.7 VIE BILIARI

Circa il 10% dei pazienti con colangite sclerosante sanno da molto di avere una patologia stenose delle vie biliari che risponde prontamente al trattamento steroideo. La maggior parte di questi mostra un infiltrato plasmacellulare intorno ai dotti biliari, che si colora intensamente per le IgG4: quindi, deve essere considerata come una colangite sclerosante IgG4-relata e non come una colangite sclerosante primitiva. La colangite coesiste molto spesso con la pancreatite IgG4-relata: nel 70% dei casi di AIP, si riscontra l'interessamento dell'albero biliare extraepatico [11]. La colangite sclerosante IgG4-relata può portare ad insufficienza epatica terminale, se non trattata [6].

2.1.3.3.8 COLECISTI

L'interessamento della colecisti è frequente, ma solitamente asintomatico. La maggior parte dei casi di colecistite IgG4-relata sono scoperti incidentalmente quando le colecisti reseccate vengono colorate per le IgG4. Tra i pazienti con AIP, almeno il 25% ha colecistite con infiltrato linfoplasmacitoide, non associata a litiasi biliare. L'istologia mostra infiltrato extramurale ricco di plasmacellule IgG4⁺, flebite obliterante e noduli infiammatori. Nell'avventizia dell'organo, si ritrovano frequentemente numerosi aggregati linfoidi [11].

2.1.3.3.9 FEGATO

Sono stati descritti due principali presentazioni cliniche della malattia epatica IgG4-relata: infiammazione portale, che ricorda la colangite sclerosante, e la presenza di una massa infiammatoria. Questa epatite ricorda l'epatite autoimmune ma è negativa agli autoanticorpi caratteristici di quest'ultima [11]. La massa può provocare ittero ostruttivo e coinvolgere i dotti ilari e perilari; questo rende necessaria la diagnosi differenziale con il colangiocarcinoma [6].

2.1.3.3.10 AORTA E RETROPERITONEO

La fibrosi retroperitoneale idiopatica, o malattia di Ormond, considerata per decenni singolarmente, è riconosciuta adesso nello spettro della periaortite cronica. Possono essere viste come parte di questo spettro sia l'aortite dell'aorta addominale IgG4-relata, sia la fibrosi perianeurismatica IgG4-relata, sia la fibrosi retroperitoneale IgG4-relata. La presentazione clinica della periaortite cronica è caratterizzata da dolore a schiena, anche, cosce e addome inferiore, edema degli arti inferiori e idronefrosi a causa dell'interessamento ureterale [6]. L'aortite infiammatoria addominale può esitare in aneurisma dell'aorta addominale ed estendersi ai tessuti periaortici e al retroperitoneo portando, rispettivamente, a periaortite e fibrosi retroperitoneale.

Le biopsie effettuate su pazienti con fibrosi retroperitoneale in stadio relativamente precoce mostrano le caratteristiche istologiche e immunoistochimiche della IgG4-RD, mentre nei pazienti con patologia più avanzata più probabilmente mostreranno fibrosi "senza pattern", che rappresenta uno stadio più avanzato della malattia. In alcuni casi, il rapporto IgG4/IgG totali è più importante rispetto al numero di plasmacellule IgG4⁺ per campo ad alto ingrandimento (HPF) per la diagnosi di fibrosi retroperitoneale [11].

2.1.3.3.11 RENE

La manifestazione renale più comune della IgG4-RD è la nefrite tubulo-interstiziale (TIN).

Nonostante sia asintomatica, la TIN può portare a insufficienza renale. I pazienti con TIN presentano solitamente ematuria, proteinuria, ridotta funzionalità renale, ipocomplementemia e alterazioni all'imaging. La proteinuria difficilmente è di range nefrosico e, quando questo accade, è associata alla presenza di glomerulonefrite (GN) membranosa [6]. Istologicamente, la TIN è caratterizzata da infiltrati linfoplasmacellulari focali o diffusi e fibrosi interstiziale. Anche quando la terapia steroidea è iniziata prontamente, l'organo può andare incontro a fibrosi e atrofia.

Come già accennato, un'altra manifestazione può essere la GN membranosa, probabilmente secondaria al deposito di immunocomplessi e non dovuta al processo infiammatorio distruttivo visibile negli altri organi. La GN membranosa IgG4-relata è chiaramente distinta dalla GN membranosa idiopatica, caratterizzata da anticorpi anti-fosfolipasi A2, che fanno parte perlopiù della sottoclasse delle IgG4 [11].

Infine, si può avere anche la formazione di masse, tipicamente piccole, multiple, bilaterali e ipocaptanti il mezzo di contrasto alla TC.

Associati a queste lesioni, spesso abbiamo ingrossamento renale (>14 centimetri) [6].

2.1.3.3.12 MENINGI

Uno studio su pochi pazienti con pachimeningite ipertrofica ha mostrato che, nella metà dei casi, erano presenti le caratteristiche istologiche della IgG4-RD. In un altro studio, la IgG4-RD è stata indicata come l'associazione più frequente con il quadro della pachimeningite ipertrofica [11]. La pachimeningite può coinvolgere sia le meningi craniche che quelle spinali e tende a formare delle piccole masse. I pazienti con questa malattia presentano cefalea, radicolopatie, paralisi dei nervi cranici o altri sintomi da compressione del midollo spinale [6].

2.1.3.3.13 CUTE

Sono riportati in letteratura pochi casi di interessamento cutaneo associato a IgG4-RD. Le lesioni tipiche sono papule eritematose, prevalentemente su capo e guance [6].

2.1.3.3.14 MESENTERE

Il coinvolgimento del mesentere porta a conseguenze drammatiche: il processo fibrosante può estendersi ad organi vitali, rendendo impossibile qualsiasi approccio chirurgico. Spesso l'infiammazione inizia in corrispondenza della radice del mesentere, rendendo difficile la differenziazione dalla fibrosi retroperitoneale [6].

2.1.3.3.15 PROSTATA

I sintomi prostatici sono ascritti facilmente a ipertrofia prostatica benigna, vista l'età medio-avanzata dei pazienti. Esistono, però, evidenze istologiche di malattia prostatica IgG4-relata [6].

2.1.3.3.16 NERVI PERIFERICI

La IgG4-RD tende a causare lesioni perineurali, sia nei nervi periferici che cranici. I nervi più colpiti sono quelli collocati nel retroperitoneo: questo spiega, probabilmente, il dolore associato. Le lesioni sono piccole masse perineurali, fino a 3 centimetri di diametro [6].

2.1.3.3.17 IPOFISI

L'ipofisite IgG4-relata è associata frequentemente a elevati livelli di IgG4 sieriche e tissutali, fondamentali per il sospetto diagnostico. Sia l'imaging che i sintomi legati all'ipopituitarismo regrediscono con il trattamento con glucocorticoidi. In caso di ipofisite, la IgG4-RD deve essere considerata nella diagnosi differenziale insieme ad altre condizioni infiltrative, come sarcoidosi, granulomatosi di Wegener, istiocitosi, linfoma [11]. Le caratteristiche dell'interessamento ipofisario IgG4-relato possono essere: ispessimento del peduncolo ipofisario, ingrossamento dell'ipofisi o formazione di una massa nella ghiandola [6].

2.1.3.3.18 PERICARDIO E MEDIASTINO

Analogamente a ciò che accade a livello pleurico, si può osservare la formazione versamenti pericardici e di noduli, sia nel foglietto viscerale che parietale.

La mediastinite fibrosante è un processo fibroinfiammatorio aggressivo localizzato nel mediastino, che porta a fibrosi progressiva a causa di proliferazione di tessuto fibroso infiltrante. Può coinvolgere le strutture vitali presenti in questa regione del corpo. Uno studio dimostra che la mediastinite fibrosante in alcuni casi soddisfa i criteri diagnostici della IgG4-RD sulla base del numero di plasmacellule IgG4⁺ nel tessuto; nella maggioranza dei casi, è caratterizzata da fibrosi storiforme e altre caratteristiche istologiche tipiche della IgG4-RD. Quindi, una parte consistente delle mediastiniti fibrosanti sembra essere parte dello spettro della IgG4-RD [6].

2.1.3.3.19 FIBROSI ANGIOCENTRICA EOSINOFILICA

La fibrosi angiocentrica eosinofila è una rara condizione caratterizzata da tumefazioni localizzate in orbite e vie aeree superiori. L'infiltrato infiammatorio della lesione è costituito da plasmacellule, linfociti e eosinofili, che prevalgono. L'aspetto istologico caratterizzante questa lesione è la presenza di arteriole di piccolo calibro circondate da strati concentrici fibrotici, un distintivo rivestimento "a cipolla" del vaso. Uno studio recente dimostra livelli molto elevati di IgG4 nel siero, associati a eosinofilia periferica e caratteristiche istologiche altamente suggestive di IgG4-RD. La presenza di tumefazioni e eosinofilia sono aspetti fondamentali di entrambe i quadri, sebbene solo raramente gli eosinofili predominano nelle tumefazioni della IgG4-RD. Sembra ragionevole includere la fibrosi angiocentrica eosinofila nello spettro della IgG4-RD [11].

2.1.4 LABORATORIO

2.1.4.1 ESAMI DI ROUTINE

Il quadro laboratoristico generale risulta normale in questi pazienti. Ciò che si può rilevare è l'alterazione degli indicatori di funzionalità d'organo, come, ad esempio,

l'elevazione della creatinina sierica o la comparsa di proteinuria in caso di interessamento renale o l'alterazione degli indicatori di colestasi o funzionalità epatica, che suggeriscono di indagare le vie biliari e il pancreas.

Eosinofilia lieve-moderata è riscontrabile nel 34% dei pazienti.

L'elevazione degli indici di flogosi acuta può essere presente: nel 23% dei pazienti, la PCR è aumentata. Anche in caso di interessamento multiorgano IgG4-correlato, la PCR si altera in modo modesto, mentre l'innalzamento della VES è solitamente più pronunciato [9].

2.1.4.2 IgG4

Il limite superiore dei valori normali di IgG4 sieriche è 135 mg/dL. Concentrazioni superiori sono un utile indizio ma non sono né necessarie né sufficienti per la diagnosi di IgG4-RD. Infatti, la maggior parte dei pazienti con IgG4-RD può avere concentrazioni di IgG4 policlonali anche di molto superiori ai valori normali, ma esiste una minoranza significativa che va dal 20% al 40% di pazienti con livelli sierici normali di IgG4, nonostante la presenza negli organi coinvolti del tipico aspetto istologico della IgG4-RD.

Inoltre, anche in soggetti sani o in persone affette da altre malattie si possono ritrovare livelli di IgG4 elevati, seppur di 2-3 volte maggiori rispetto ai valori normali [11].

Possiamo, quindi, affermare il riscontro di livelli elevati di IgG4 sierici ha una bassa specificità (60%) e una basso valore predittivo per la diagnosi di IgG4-RD (34%): affidarsi solo ai livelli di IgG4 porterebbe a sottodiagnosticare la IgG4-RD [8].

Spesso, livelli maggiori di IgG4 sono correlati a un numero maggiore di organi interessati dalla malattia; diversamente, non esiste correlazione tra attività di malattia o risposta al trattamento e livelli di IgG4 [11]. In più, livelli elevati di IgG4 sembrano identificare un gruppo più "infiammatorio" di IgG4-RD caratterizzato da ampio interessamento d'organo, alti livelli degli indici di flogosi, ipocomplementemia e – forse – maggior resistenza al trattamento rispetto alle IgG4-RD con livelli normali di IgG4. In uno studio su pazienti con AIP, si riporta una maggior frequenza di alcuni sintomi, un maggior numero di lesioni extrapancreatiche e una dimensione maggiore delle lesioni pancreatiche nei pazienti con livelli di IgG4 più elevati [9].

2.1.4.3 IgG4/IGG TOTALI

Il rapporto IgG4/IgG è inferiore al 5% nei soggetti normali, mentre il valore medio nei pazienti con IgG-RD è risultato essere 40% (range 25%-86%) [11].

2.1.4.4 GAMMAGLOBULINE

Livelli di IgG sieriche totali superiori a 1800 mg/dL (ipergammaglobulinemia) sono riportati nel 61% dei pazienti. La maggior parte degli studi riporta livelli medi di IgG compresi tra 1800 e 3600 mg/dL. Uno studio recente riporta la presenza di una banda monoclonale nel siero dei pazienti affetti da IgG4-RD causata dalla migrazione relativamente ristretta di IgG4 policlonali, che possono formare un caratteristico “ponte” che unisce le frazioni β e γ nell'elettroforesi delle proteine sieriche (β - γ bridging) (Fig.12).

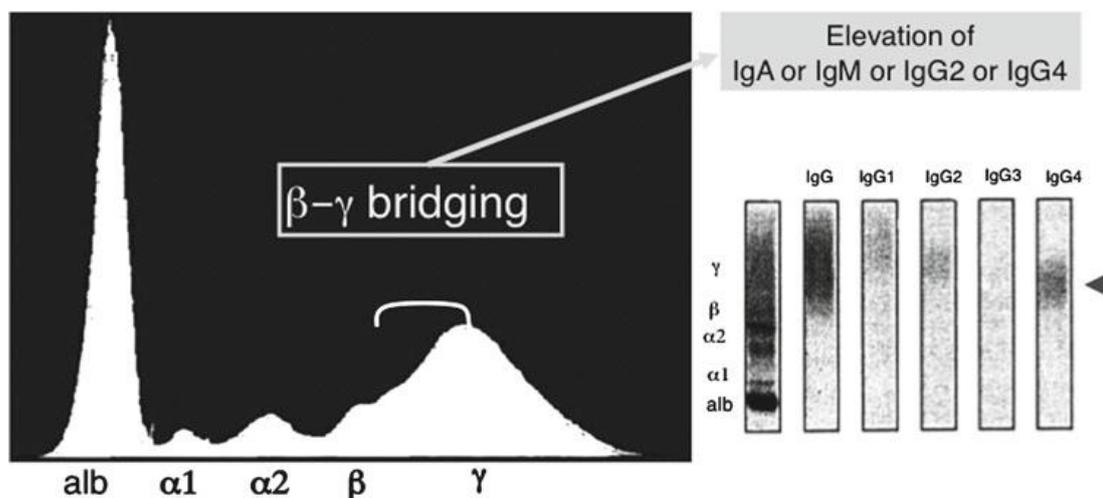


Figura 11 Tracciato elettroforetico delle proteine sieriche in IgG4-RD [11]

2.1.4.5 IgE

Risultano elevate nel 58%. Le citochine prodotte dai linfociti Th2, molto presenti nei processi immunologici correlati alla IgG4-RD, stimolano infatti la proliferazione degli eosinofili e la produzione delle IgE [2].

2.1.4.6 AUTOANTICORPI

Nessun autoanticorpo specifico è stato riscontrato nei pazienti con IgG4-RD ma anticorpi non specifici sono comuni. La prevalenza di sieri ANA+ è di quasi il 30%, mentre un fattore reumatoide è stato trovato nel 20% dei sieri, solitamente entrambi a basso titolo.

2.1.4.7 SISTEMA DEL COMPLEMENTO

L'ipocomplementemia è molto comune tra i pazienti con malattia renale IgG4-relata [9]. Circa la metà dei pazienti con malattia renale IgG4-relata sono ipocomplementemici [6]. Il meccanismo per questa associazione non è chiaro, dato che, teoricamente, le IgG4 non legano il complemento. Probabilmente, gli immunocomplessi formati da altre sottoclassi che legano il complemento, come IgG1 e IgG3, possono rendere conto di questo dato.

2.1.4.8 PLASMABLASTI

Uno studio recente indica che i pazienti con IgG4-RD hanno un importante aumento di plasmablasti circolanti CD19+ CD20- CD38+ CD27+. I plasmablasti possono essere identificati con la citometria di flusso sul sangue periferico dei pazienti. La concentrazione dei plasmablasti IgG4⁺ è aumentata anche nei pazienti con IgG4-RD con livelli di IgG4 normali. In più, il numero dei plasmablasti sembra diminuire drasticamente in terapia e aumentare di nuovo durante le riprese di malattia; questo sembra proporre il numero di plasmablasti come marker per la diagnosi e la valutazione di attività di malattia e di risposta al trattamento [9]. Per quel che riguarda invece il rischio di recidiva dopo trattamento immunosoppressivo (Rituximab), i livelli di plasmablasti sono meno predittivi di ricaduta rispetto al livello di IgG4, IgE ed eosinofili pre-terapia [13].

2.1.5 ANATOMIA PATOLOGICA

Le caratteristiche morfologiche sono la base fondamentale per la diagnosi della IgG4-RD. La correlazione con la clinica e con l'imaging devono essere scrupolosi e sono spesso necessari per arrivare alla diagnosi definitiva. Comunque, la diagnosi di IgG4-RD non può essere stabilita con certezza in assenza della colorazione immunohistochimica per le IgG4: necessita, quindi, sia delle appropriate caratteristiche istologiche, sia di un aumentato numero di plasmacellule o del rapporto IgG4/IgG totali nel tessuto.

I tre principali aspetti istologici sono:

- Denso infiltrato linfoplasmacitoide
- Fibrosi, organizzata almeno localmente in pattern storiforme
- Flebite oblitterante

In aggiunta:

- Flebite senza oblitterazione del lume
- Aumentato numero di eosinofili

Questi ultimi due, presi da soli, non sono specifici né sensibili per la diagnosi di IgG4-RD.

Nella maggior parte dei casi, una diagnosi istologica affidabile richiede almeno due delle tre caratteristiche principali, frequentemente rappresentati dalla fibrosi storiforme e dall'infiltrato linfoplasmacitoide. Esistono delle eccezioni alla regola in alcuni organi, come le ghiandole lacrimali, i polmoni, le ghiandole salivari minori e i linfonodi, dove la fibrosi storiforme o la flebite oblitterante possono essere scarsamente rappresentati o assenti.

2.1.5.1 INFILTRATO LINFOPLASMACITOIDE

La maggior parte delle cellule sono piccoli linfociti distribuiti diffusamente nella lesione e mescolate a plasmacellule (Fig. 12).

Occasionalmente, si possono osservare

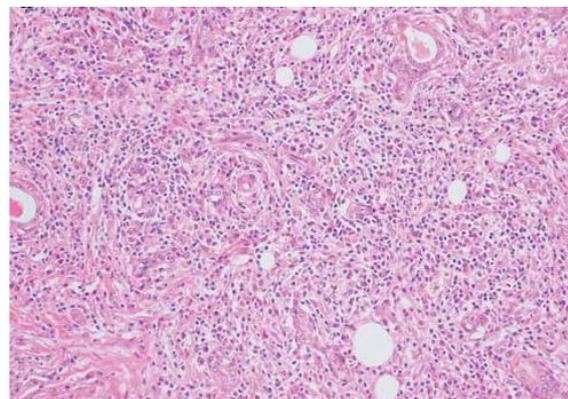


Figura 12 Sialoadenite IgG4-RD: ghiandola salivare infiltrata da linfociti e plasmacellule.[17]

centri germinativi. L'infiltrato è composto prevalentemente da linfociti T, con focali aggregati di linfociti B. Le plasmacellule sono una componente essenziale, che può anche essere predominante. Gli eosinofili possono esserci in quantità variabili, da scarsa a moderata, e solo raramente, nel caso della fibrosi angiocentrica eosinofilia, sono predominanti. Rari macrofagi possono essere presenti.

2.1.5.2 FIBROSI STORIFORME

L'aspetto della fibrosi storiforme ricorda i raggi una ruota di carro con cellule fusate che si irradiano da un centro (Fig.13). Le cellule fusate, che possono essere fibroblasti o miofibroblasti, risultano immerse nell'infiltrato linfoplasmacitoide. Talvolta, in campioni limitati, il pattern storiforme non viene osservato.

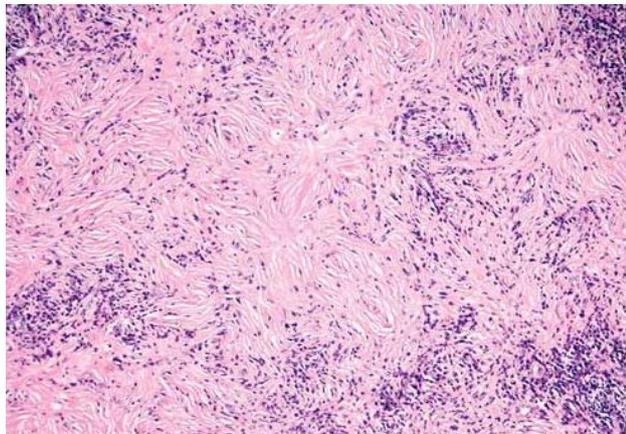


Figura 13 Malattia orbitaria IgG4-RD: fibrosi storiforme [15]

2.1.5.3 FLEBITE OBLITERANTE

I lumi venosi sono oblitterati da un denso infiltrato linfoplasmacitoide. I linfociti e le plasmacellule si possono ritrovare sia all'interno della parete della vena, sia nel lume. Sono compatibili con la diagnosi di IgG4-RD anche vene con il lume parzialmente oblitterato con un infiltrato infiammatorio transmurale. Le vene completamente obliterate spesso richiedono la colorazione

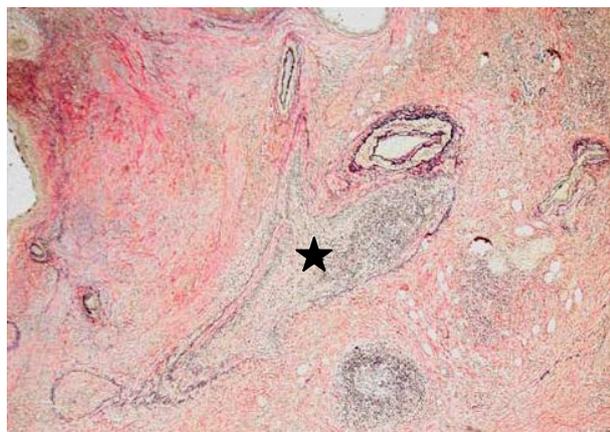


Figura 14 Pancreatite IgG4-RD: la vena (★) è completamente oblitterata da cellule infiammatorie. L'arteria adiacente è pervia. La colorazione con elastina rende evidente la parete dei vasi.[17]

per l'elastina per essere identificate (Fig.14). Vene obliterate ma prive

dell'infiammazione non sono considerate nella diagnosi di IgG4-RD. La presenza di arterite è rara e osservata nei casi di AIP, ma non esclude la diagnosi. L'arterite IgG4-relata è caratterizzata da infiltrato linfoplasmacitoide, con o senza obliterazione del lume vascolare. Forme necrotizzanti di arterite non sono state osservate.

2.1.5.4 CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE INCOMPATIBILI CON LA DIAGNOSI DI IgG4-RD

Le due caratteristiche istologiche incompatibili con la diagnosi di IgG4-RD sono:

- granulomi con cellule giganti epitelioidei
- abbondante infiltrato neutrofilico

I granulomi non escludono la diagnosi quando coesistono con un quadro tipico di IgG4-RD. Allo stesso modo, microascessi costituiti da neutrofili e zone necrotiche, sono accettabili solo in presenza di erosioni e ulcerazioni, tipicamente nelle vie aeree superiori, oppure nel polmone.

2.1.5.5 VALUTAZIONE QUANTITATIVA DI IgG4 E PLASMACELLE IgG4+

La quantificazione delle IgG4 tissutali è fondamentale per la diagnosi di IgG4-RD, soprattutto nei casi in cui i livelli sierici di IgG4 sono normali. Inoltre, è semplice da effettuare, facilmente riproducibile e fornisce una conferma per la diagnosi.

Il numero di plasmacellule IgG4+ ha un range molto ampio e varia in base all'organo a causa del grado di fibrosi al momento della diagnosi (Fig. 15). Nella pancreatite IgG4-relata, il ritrovamento di un numero di plasmacellule IgG4+ >30 per HPF è considerato essere specifico. Il cut-off proposto come parte dei requisiti fondamentali per la diagnosi è >10 per HPF.

Il rapporto tra le plasmacellule IgG4+ e quelle IgG+ è più affidabile rispetto alla conta delle plasmacellule IgG4+ per stabilire la diagnosi. Infatti, esistono lesioni non IgG4-relate associate ad un alto numero di plasmacellule IgG4+ per HPF solo perché l'infiltrato è ricco di plasmacellule: la conta delle plasmacellule IgG4+, da sola, non aiuta a distinguere queste situazioni dalla IgG4-RD.

Alcuni ricercatori hanno proposto un rapporto tra plasmacellule IgG4+/IgG+ >40% come cut-off ragionevole per ogni organo. Questo rapporto è stato inoltre adottato come criterio diagnostico istologico per la IgG4-RD. Questo rapporto deve essere supportato da altre evidenze perché, da solo, non può essere sufficiente: questo si applica in particolare ai casi in cui il numero di plasmacellule per HPF è basso. Per quanto riguarda l'aorta, il valore richiesto per la diagnosi di aortite IgG4-relata è >50%.

La maggior parte dei laboratori usa un anticorpo monoclonale anti-IgG4 umana, preparata per legare la porzione Fc dell'IgG4. In alcuni casi, vengono usati anche anticorpi policlonali. Il tipo di anticorpo usato non ha un impatto significativo sulla conta delle plasmacellule IgG4⁺, ma l'anticorpo monoclonale colora in maniera più chiara le plasmacellule, per cui è preferibile.

Altre patologie che mostrano un aumento del numero di plasmacellule IgG4+ tissutali sono linfomi, neoplasie solide e malattie infiammatorie.

Devono essere esclusi i linfomi a cellule B di basso grado, soprattutto in quei casi di possibile IgG4-RD con infiltrato linfoplasmacitoide molto florido e cellule con caratteristiche atipiche. I linfomi che possono più facilmente mimare la IgG4-RD sono i linfomi della zona marginale extranodali, linfomi follicolari e linfomi angioimmunoblastici. La diagnosi differenziale è possibile grazie alla positività del CD20 o alla restrizione per una catena leggera presenti nei linfomi; inoltre, nella maggior parte dei casi, la popolazione prevalente della IgG4-RD è quella dei linfociti T, diversamente dai linfomi a cellule B.

Malattie infiammatorie che possono associarsi all'aumento di plasmacellule IgG4+ sono, ad esempio, vasculiti ANCA-associate, artrite reumatoide, colangite sclerosante primitiva, rinosinusiti, malattie infiammatorie croniche intestinali, gastrite autoimmune ed altre ancora. Nessuna di queste condizioni, però, mostra le altre caratteristiche istologiche tipiche della IgG4-RD.

I tessuti neoplastici possono essere infiltrati in misura variabile da plasmacellule IgG4+, distribuite solitamente in maniera focale e non accompagnate dalle altre caratteristiche istologiche delle IgG4-RD. Inoltre, plasmacellule IgG4+ possono essere ritrovate in linfonodi che drenano neoplasie o nel tessuto peritumorale. Per questo, una biopsia effettuata nel tessuto periferico di una neoplasia, può essere interpretata erroneamente come IgG4-RD. Per evitare questo errore, è necessario

ricercare con attenzione le altre caratteristiche istologiche della IgG4-RD, oppure ottenere un altro campione.

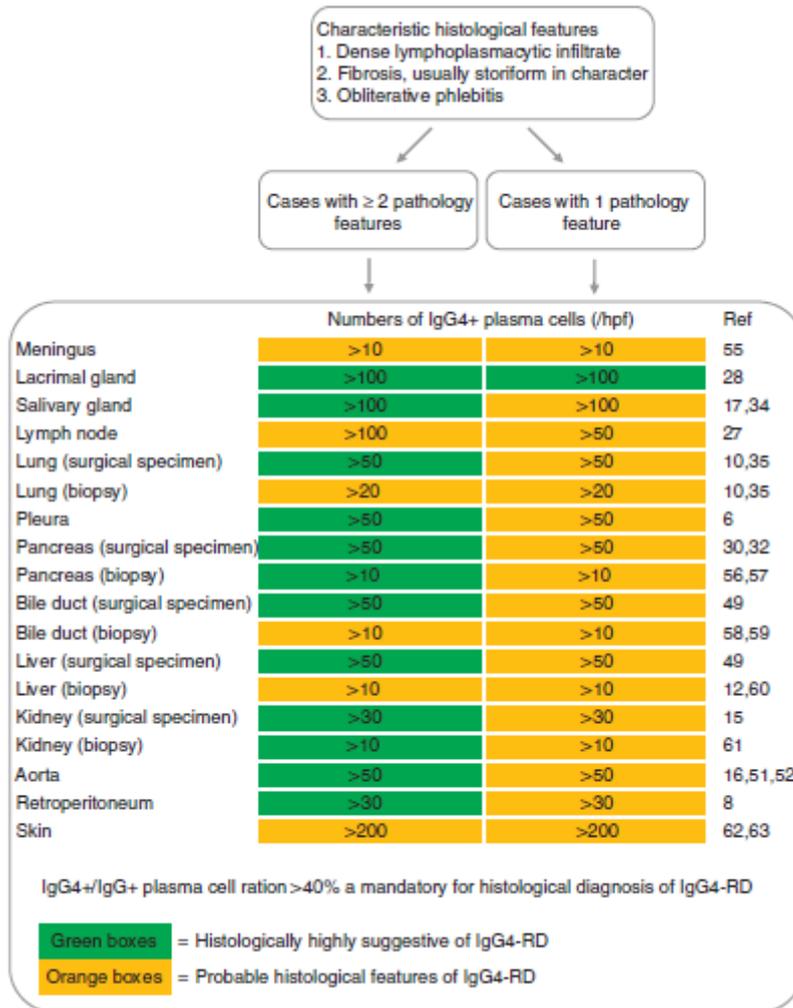


Figura 15 Schema per la diagnosi istologica della IgG4-RD [17]

2.1.5.6 TERMINOLOGIA

Istologia altamente suggestiva di IgG4-RD: questa categoria richiede la presenza di almeno due delle tre caratteristiche principali (fibrosi solitamente storiforme, flebite obliterante, abbondante infiltrato linfoplasmacitoide) per tutti gli organi tranne le ghiandole lacrimali, dove sia flebite che fibrosi possono mancare. In questo caso, un solo criterio può essere sufficiente. Inoltre, deve esserci un rapporto tra plasmacellule IgG4+/IgG+ >40%; se il campione proviene dall'aorta, il rapporto deve essere >50%.

Istologia probabilmente suggestiva di IgG4-RD: questa categoria comprende tre diverse situazioni. La prima situazione è quella in cui solo una delle tre caratteristiche istologiche tipiche è soddisfatta, ma le plasmacellule IgG4+ superano il cut-off richiesto per la diagnosi. La seconda riguarda l'interessamento di meningi o cute, di cui abbiamo poche informazioni, a causa della rarità di questi casi. La terza, si verifica quando il campione è prelevato con agobiopsia: la quantità di tessuto è troppo scarsa. In questi casi, la diagnosi istologica è solo probabile, per cui sono necessarie ulteriori evidenze, che solitamente includono l'elevazione delle IgG4 sieriche e l'interessamento di almeno un altro organo, dimostrato con radiologia o istologia.

Insufficiente evidenza istologica di IgG4-RD: questa categoria comprende tutti i quadri istologici non inclusi nei due gruppi precedenti. Il riscontro di questo quadro istologico non esclude la diagnosi di IgG4-RD e può essere dovuto alla progressione fibrotica, agli effetti di una terapia precedente o ad artefatti nel campionamento [14].

2.1.6 IMAGING

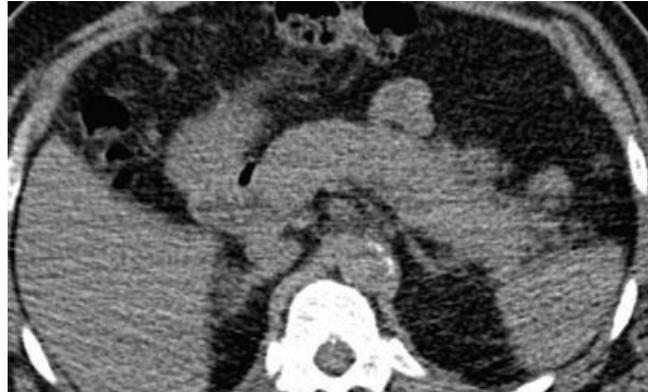
Le indagini radiologiche nella IgG4-RD possono dare risultati estremamente variabili. Di solito, l'aspetto non è specifico e non permette una distinzione affidabile tra neoplasie e IgG4-RD [2]. Nonostante questo, la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM) giocano un ruolo fondamentale.

Alla TC le lesioni IgG4-relate appaiono come un aumento delle dimensioni dell'organo o francamente come pseudotumori. Le stesse lesioni emettono un basso segnale alla RM T2-pesata.

Alcuni studi hanno suggerito l'utilità della tomografia ad emissione di positroni (PET) con 18-fluorodesossiglucosio (18-FDG): la PET pare mostrare in quasi il 70% dei casi, una malattia più estesa rispetto a quella individuata con le metodiche standard (esame obiettivo, ecografia e TC). Inoltre, può essere più sensibile, rispetto alla diagnostica tradizionale, nello studio dell'interessamento vascolare e di altri organi specifici, come linfonodi e ghiandole salivari, mentre risulta meno sensibile per valutare lesioni di piccole dimensioni, encefalo e reni [9].

2.1.6.1 PANCREAS E VIE BILIARI

Sia l'ecografia che la TC spesso mostrano l'ingrossamento del pancreas [6], focale nel 56% e diffuso nel restante 44%. Le lesioni focali sono facilmente confuse con neoplasie. Quando il pancreas è diffusamente



aumentato di dimensioni, si parla di pancreas "a salsiccia"

Figura 16 Pancreatite IgG4-RD alla TC: aumento diffuso delle dimensioni del pancreas [6]

(sausage-shaped) [9] (Fig. 16). Nelle immagini con mezzo di contrasto, si può osservare una rima periferica ipocaptante che circonda l'organo, dovuta all'infiammazione del tessuto adiposo peripancreatico [6]. Si può ritrovare anche un pancreas atrofico, diffusamente o solo a livello della coda. Un pancreas di dimensioni normali, con enhancement ridotto diffusamente o normale, o con aspetti simil-pancreatite acuta (edema e infiammazione) sono molto rari.

Stenosi biliari, dovute a processi infiammatori a carico dei dotti, sono il segno chiave della colangite sclerosante IgG4-relata. A seconda della localizzazione della stenosi, sono state classificate in 4 tipi: tipo 1, quando è localizzata al coledoco; tipo 2, quando sono coinvolti i dotti intraepatici; tipo 3, coinvolgimento dell'ilo e delle vie biliari distali; tipo 4, stenosi dell'ilo. Il tipo 1 è il più frequente, presentandosi nei due terzi dei casi, mentre gli altri tipi sono presenti in maniera simile negli altri pazienti (15%, 13%, 11%). Per differenziare la colangite sclerosante IgG4-relata dalle altre condizioni infiammatorie delle vie biliari, è utile considerare il coinvolgimento della colecisti, la presenza di stenosi continue e l'ispessimento della parete del coledoco maggiore di 2,5 millimetri, mentre la localizzazione e la lunghezza delle stenosi del coledoco sono meno utili [9].

2.1.6.2 GHIANDOLE SALIVARI

Studi ecografici effettuati per individuare l'interessamento IgG4-relato delle ghiandole salivari hanno mostrato che il reperto più frequente è la presenza di aree ipoecogene multiple in ghiandole aumentate di dimensioni.

Con la RM, la caratteristica riportata più frequentemente sono lesioni ben delimitate iso/ipointense in T2, con enhancement omogeneo, senza segni di compressione o occlusione vascolare.

2.1.6.3 OCCHIO E TESSUTI PERIOCULARI

La TC mostra non solo che l'organo più colpito di questo apparato, spesso bilateralmente, è la ghiandola lacrimale (Fig. 17), ma anche il coinvolgimento di altri tessuti come le branche del nervo trigemino, i muscoli extraoculari, il tessuto adiposo orbitario, il condotto nasolacrimale, le palpebre e anche le strutture ossee delle cavità orbitali [9]. Sono state



Figura 17 Dacrioadenite IgG4-RD: TC coronale che mostra l'ingrossamento della ghiandola lacrimale sinistra. Si nota anche la sinusite mascellare.[6]

osservate anche tumefazioni del tessuto orbitario o periorbitario (pseudotumori orbitali), senza coinvolgimento della ghiandola lacrimale

[6]. Le lesioni degli annessi oculari mostrano margini ben definiti alla TC senza mezzo di contrasto, mentre alla RM appaiono isointense in T1 e ipointense in T2, con struttura omogenea e rimodellamento osseo senza distruzione [9].

2.1.6.4 POLMONE

In base alle immagini ottenute con la TC, si individuano varie lesioni polmonari IgG4-relate, come l'ispessimento della trama bronco vascolare, opacità "ground-glass", coinvolgimento dell'interstizio, noduli solidi che ricordano tumori primitivi. Versamenti pleurici sono rari, ma talvolta dominano il quadro; ispessimenti pleurici

marcati non sono comuni. Linfadenopatie ilari e/o mediastiniche accompagnano la maggior parte dei casi di malattia polmonare IgG4-relata [9].

2.1.6.5 RENE

La TC mostra anomalie nel 70% dei soggetti con malattia renale IgG4-relata (IgG4-RKD) [9]. Il reperto più comune è la presenza di piccole lesioni multiple ipodense e bilaterali [6] (Fig. 18), che alla RM appaiono ipointense in T2. L'atrofia renale si ritrova raramente al

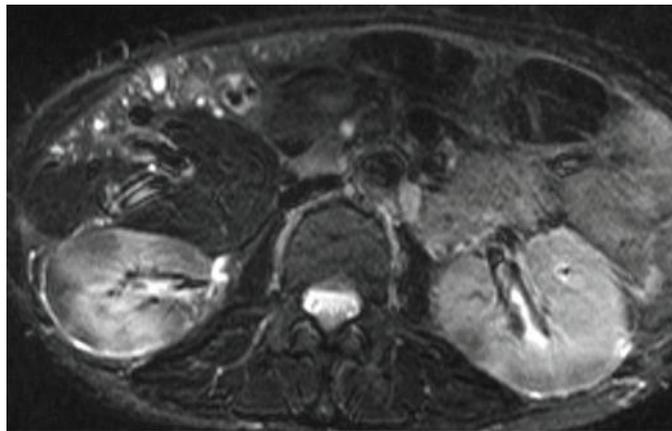


Figura 18 TIN IgG4-RD: TC che mostra numerose lesioni corticali ipodense e marcato aumento di dimensione di entrambi i reni. [6]

momento della diagnosi, ma è stata riportata in quasi la metà dei casi durante il follow-up, anche nei pazienti che sembravano rispondere alla terapia. Sono stati riportati anche casi di aumenti di dimensione marcati (>14 cm) e bilaterali. Noduli solitari e cisti sono rari [9].

2.1.6.6 AORTA E RETROPERITONEO

L'ispessimento della parete dell'aorta toracica e un enhancement omogeneo è tipicamente presente nella fase tardiva alla TC con mezzo di contrasto. Questo pare corrispondere all'infiammazione sclerosante localizzata prevalentemente nell'avventizia [6] (Fig. 19).



Figura 19 Angio-TC che mostra dissecazione dell'arco dell'aorta. L'esame istologico dell'aorta reseccata ha rivelato un'aortite IgG4-RD. [6]

Per quanto riguarda l'aorta addominale, periaortite, dilatazione aortica e aneurismi sono reperti comuni alla TC in pazienti con IgG4-RD [9]. I radiologi classificano la periaortite cronica in tre sottotipi a seconda

della localizzazione: periaortica/periarteriosa, che coinvolge il tessuto connettivo attorno all'aorta addominale e i suoi rami principali; periureterale; a placca, che coinvolge ampiamente il retroperitoneo [6].

La localizzazione primaria della fibrosi retroperitoneale è stata documentata con la TC in sede periaortica (83%) e periiliaca (67%), anche se può ritrovarsi anche a livello perisacrale, perirettale, pericavale e retrovescicale. Numerose linfadenopatie sono state riportate in associazione alla fibrosi retroperitoneale IgG4-relata [9].

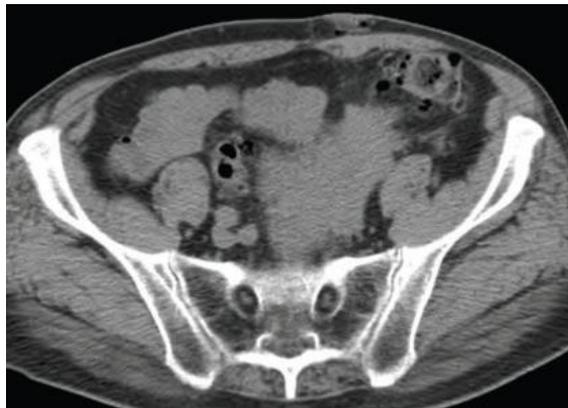


Figura 20 Fibrosi retroperitoneale IgG4-RD: TC che mostra una massa nella pelvi, adiacente alla vescica, che comprime l'uretere sinistro. Il paziente si era presentato con idronefrosi sinistra. [6]

2.1.6.7 SISTEMA NERVOSO CENTRALE

L'interessamento meningeo sotto forma di pachimeningite ipertrofica è rilevabile all'imaging come una massa o come ispessimento, diffuso o localizzato, della dura madre craniale o spinale.

La RM permette di individuare il coinvolgimento dell'ipofisi, che può apparire aumentata di dimensioni nella porzione anteriore e con un peduncolo ipofisario ispessito [9] (Fig. 21). Sono stati riportati anche casi di pseudotumor infiammatorio intracerebrale [15].

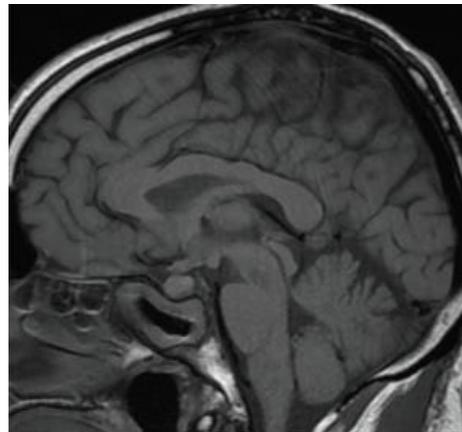


Figura 21 Ipofisite IgG4-RD: RM che mostra ingrossamento dell'ipofisi e ispessimento del suo peduncolo. Anche le pareti del seno sfenoidale sono ispessite .[6]

2.1.7 DIAGNOSI

La diagnosi di IgG4-RD è molto complessa, sia perché può colpire molti organi di apparati diversi, sia perché la presentazione clinica, laboratoristica e istologica può

essere molto eterogenea. Il sospetto di IgG4-RD deve venire in presenza di tumefazioni o aumento di dimensioni in uno o più organi. L'algoritmo diagnostico parte quindi dalla clinica, solitamente, per proseguire con approfondimenti sierologici e radiologici, fino all'istologia [9]. Solo la combinazione di tutti questi aspetti ci può dare la diagnosi definitiva: la mancanza di alcuni rende meno certa la diagnosi. Umehara e al. hanno elaborato i criteri per la diagnosi di IgG4-RD e criteri per valutare il coinvolgimento IgG4-relato di alcuni organi. Nella Tabella 1 si può osservare che la diagnosi definitiva di IgG4-RD può essere posta in caso di clinica, sierologia e istologia indicative di questa patologia. Nel caso in cui la sierologia, data da elevati livelli di IgG4, sia negativa, la malattia è ritenuta probabile. Quando, invece, a mancare è la conferma istologica, la diagnosi è "solo" possibile.

| Diagnosis | Criteria |
|------------|--|
| Definitive | Diffuse or local swelling in single or multiple organs Serum IgG4 levels ≥ 135 mg/dl Histology Lymphoplasmacytic infiltrate and fibrosis IgG4-positive plasma cells: ratio of IgG4/IgG positive cells $>40\%$, and >10 IgG4-positive plasma cells/high power field |
| Probable | Diffuse or local swelling in single or multiple organs Histology Lymphoplasmacytic infiltrate and fibrosis IgG4-positive plasma cells: ratio of IgG4/IgG positive cells $>40\%$ and >10 IgG4-positive plasma cells/high power field |
| Possible | Diffuse or local swelling in single or multiple organs Serum IgG4 levels ≥ 135 mg/dl or >2 -fold upper limit of normal |

Tabella 1 Criteri diagnostici della IgG4-RD [12]

Anche quando i criteri diagnostici della Tabella 1 non permettono la diagnosi di IgG4-RD, si possono usare i criteri organo-specifici [15]. L'importanza della conferma istologica è evidenziata dai criteri di Boston, ritenuti molto utili per categorizzare i criteri istologici: le categorie individuate con i criteri di Boston sono associati con differenze nella probabilità di diagnosi di IgG4-RD [16].

2.1.7.1 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

La diagnosi differenziale va posta con le neoplasie solide degli organi coinvolti, con i linfomi e con le malattie simili nella presentazione: sindrome di Sjogren, malattia di Castleman multicentrica, granulomatosi di Wegener, colangite sclerosante primitiva,

fibrosi retroperitoneale secondaria, sindrome di Churg-Strauss, sarcoidosi [15]. Specialmente quando la malattia interessa un singolo organo ed è stata ritrovata occasionalmente in campioni bioptici o in indagini radiologiche, può essere difficile distinguerla da un tumore. Allo stesso modo, la IgG4-RD che interessa più organi, deve essere differenziata da linfomi o malattia metastatica; anche la sintomatologia in questi casi non aiuta, dato che eventuali perdite di peso e linfadenopatie possono esserci in entrambe le situazioni. Le indagini di laboratorio possono indirizzare la diagnosi verso la IgG4-RD in caso di eosinofilia, ipergammaglobulinemia, aumento dei livelli sierici di IgE e, soprattutto delle IgG4.

Il ritrovamento di un elevato numero di plasmacellule IgG4+ nei tessuti è più specifico, ma non dobbiamo dimenticare che anche questo può esserci in altre condizioni (Tab. 2): in queste mancano, però, gli altri aspetti istologici tipici della IgG4-RD. Per questo, l'istologia è, ad oggi, lo strumento più affidabile per la diagnosi differenziale. La correlazione tra istologia e clinica rimane, inoltre, essenziale [9].

| |
|---|
| Vasculitis |
| Eosinophilic granulomatous with polyangiitis (Churg-Strauss) |
| Granulomatosis with polyangiitis (Wegener) |
| Hypocomplementemic urticarial vasculitis |
| Hematological malignancy |
| Castleman disease |
| Extranodal marginal zone B-cell lymphoma |
| Follicular lymphoma |
| Angioimmunoblastic lymphoma |
| Solid-organ neoplasms |
| Pancreatic cancer |
| Lung cancer |
| Sarcoma |
| Infections |
| Pulmonary abscess |
| Epstein-Barr virus-related lymphadenopathy |
| Aortitis caused by chronic <i>Staphylococcus aureus</i> infection |
| Digestive diseases |
| Inflammatory bowel disease |
| Diverticulitis |
| Other systemic diseases |
| Rheumatoid arthritis (synovium and lymph nodes) |
| Histiocytosis (Rosai-Dorfman disease) |

Tabella 2 Diagnosi differenziale in pazienti sospettati di IgG4-RD con infiltrato tissutale costituito da plasmacellule IgG4+ [8]

2.1.8 TRATTAMENTO

2.1.8.1 GLUCOCORTICOIDI

La terapia di prima linea è costituita dai glucocorticoidi. Le ricadute sono presenti nei pazienti sottoposti a trattamento ma risultano meno frequenti rispetto ai pazienti non trattati con, rispettivamente, il 32% e il 70% ($P=0,01$) di pazienti con ricadute in un periodo di osservazione medio di 24 mesi. Altri studi giapponesi mostrano anche che il trattamento con glucocorticoidi riduce il tempo necessario per ottenere la remissione e migliora la funzione esocrina del pancreas nella pancreatite autoimmune IgG4-relata. Il trattamento con glucocorticoidi previene il danno d'organo sia nel breve che nel lungo periodo e il coinvolgimento di altri organi [16]. Inoltre, nel caso di pancreatite IgG4-relata, ricercatori coreani propongono la terapia steroidea per differenziare la pancreatite dal carcinoma pancreatico, in quanto nella prima si ha la risoluzione dell'edema pancreatico o della stenosi del dotto pancreatico principale a seguito di poche settimane di terapia, cosa che non accade in caso di neoplasia [5].

La risposta al trattamento è rapida e i sintomi scompaiono solitamente entro 2 settimane. Allo stesso modo i livelli di IgG4 nel siero dei pazienti si riducono, anche se solo in pochi pazienti tornano a valori normali. Anche i marker di funzionalità d'organo e le tecniche di imaging mostrano un netto miglioramento [17].

Il glucocorticoide utilizzato è il prednisolone, a una dose iniziale di 0,6 mg/kg/day per 2-4 settimane, che viene poi ridotta di 5 mg ogni 1-2 settimane in base alla sintomatologia, in un periodo di 3-6 mesi [2]. Secondo gli autori giapponesi, una terapia di mantenimento con 2,5-5 mg/day fino a 3 anni è raccomandata, mentre un altro approccio è quello di interrompere la terapia steroidea entro i 3-6 mesi dall'inizio del trattamento [18].

2.1.8.2 FARMACI “STEROID-SPARING”

Sulla base dell'efficacia in altre patologie autoimmuni, sono stati utilizzati anche azatioprina, methotrexate, micofenolato mofetile e, in misura minore, 6-mercaptopurina e ciclofosfamide. La loro principale indicazione è quella di ridurre

l'utilizzo di steroidi, soprattutto a causa degli effetti collaterali a lungo termine. L'approccio della Mayo Clinic è quello di somministrare azatioprina (2-2,5 mg/kg/day) o micofenolato mofetile (750 mg x2/day) solo ai pazienti con pancreatite IgG4-relata che hanno avuto una riacutizzazione di malattia durante la riduzione di dosaggio del prednisolone almeno una volta. Dosaggi inferiori sono risultati inefficaci. I dati sono comunque molto limitati a causa di follow-up molto brevi (in media 6 mesi) [17].

Rimane discusso, invece, l'utilizzo dei farmaci immunosoppressivi steroid-sparing in prima linea in associazione con i glucocorticoidi. Questo approccio è accettato in Europa, Nord America e Asia, con l'eccezione dei ricercatori giapponesi. La maggior parte degli esperti concorda con l'aggiunta del farmaco steroid-sparing nei pazienti che non riescono a ridurre il dosaggio dei glucocorticoidi a causa di malattia attiva persistente o in prospettiva di continuare il farmaco come terapia di mantenimento; il suo utilizzo è, a maggior ragione, giustificato qualora un'eventuale ricaduta durante lo scalaggio dello steroide potesse esitare in un danno d'organo irreversibile [18].

2.1.8.3 RITUXIMAB

Si tratta di un anticorpo monoclonale chimerico costituito da regioni variabili murine anti CD20 umano e dalla regione costante di una IgG1 umana. Il legame dell'anticorpo con CD20 provoca la riduzione del numero delle cellule B che lo esprimono sulla loro membrana. Solitamente, la riduzione delle Ig non avviene in trattamento con Rituximab, a causa della mancanza di espressione di CD20 da parte delle plasmacellule, ma nella IgG4-RD questo farmaco porta a una riduzione drastica dei livelli di IgG4 sierici, differentemente dalle altre sottoclassi di IgG [18] (Fig. 22). La velocità con cui i valori di IgG4 si riducono, fin dall'inizio del trattamento, in risposta alla riduzione del numero di cellule B, suggerisce che la maggior parte delle IgG4 siano prodotte da plasmacellule e plasmablasti a breve sopravvivenza; il fatto che non ci sia una completa normalizzazione dei valori, invece, fa capire che c'è un esiguo numero di plasmacellule a lunga sopravvivenza nel midollo osseo che produce bassi livelli di IgG4. La riduzione delle plasmacellule a breve sopravvivenza e dei plasmablasti in corso di trattamento con Rituximab non risulta da un'azione diretta del farmaco su queste cellule, che sono CD20-, ma è attribuibile

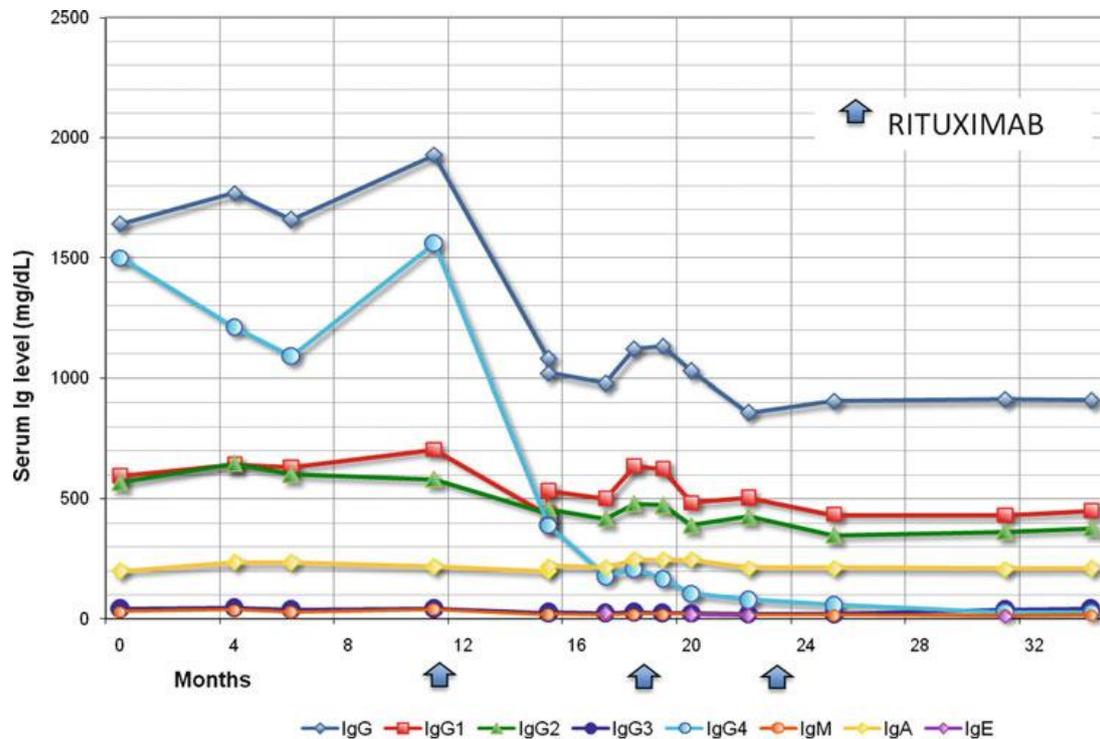


Figura 22 Livelli di IgG4 e Rituximab: si nota come la riduzione delle IgG4 sia molto più marcata rispetto alle altre sottoclassi. [11]

all'eliminazione delle cellule B CD20+, da cui plasmacellule e plasmablasti originano [18]. La netta risposta al trattamento con Rituximab è compatibile con l'idea che le plasmacellule IgG4⁺ o le cellule B in generale e, forse, anche le IgG4, siano fondamentali per la presentazione dell'antigene ai linfociti Th2 o ai linfociti T di memoria effettori CD4⁺ e, quindi, per il loro mantenimento. I linfociti B provvedono, inoltre, alla produzione antigene-indipendente di fattori, come IL-6, che promuovono la proliferazione dei linfociti T. Il probabile meccanismo della remissione duratura, in risposta alla riduzione dei linfociti B da parte di Rituximab, è quello di interferire con la sopravvivenza delle cellule T di memoria CD4⁺.

Nei tessuti, a seguito di terapia con Rituximab, si osserva la risoluzione dell'infiltrato infiammatorio e una parziale riduzione della fibrosi. I macrofagi, infatti, possono promuovere sia la fibrosi che la risoluzione della fibrosi stessa, a seconda degli stimoli a cui sono esposti. Quindi, la risoluzione, almeno parziale, della fibrosi può essere possibile finché nel tessuto c'è un esteso infiltrato infiammatorio e non solo tessuto fibroso cicatriziale. Queste evidenze sottolineano l'importanza di

diagnosticare precocemente la IgG4-RD e iniziare prontamente la terapia immunosoppressiva [6].

2.1.8.4 CONSIDERAZIONI SUL TRATTAMENTO

In letteratura, abbiamo pochi dati sui follow-up, che riguardano, comunque, periodi di osservazione relativamente brevi. Sono riportati casi di miglioramenti spontanei, anche se la durata del periodo libero da malattia non è nota. La tendenza alla remissione spontanea in alcuni pazienti ha portato a un dibattito riguardante l'utilità della terapia farmacologica e le sue indicazioni [17].

Non tutte le manifestazioni richiedono un trattamento immediato: le linfadenopatie IgG4-relate, ad esempio, possono rimanere asintomatiche e avere un comportamento indolente per decenni. In questi casi, così come nell'ingrossamento lieve delle ghiandole sottomandibolari [18], il “watchful waiting” può essere un'opzione prudente. Anche il numero di organi interessati non è correlato direttamente con la necessità di trattamento: esistono casi con molti organi interessati che non richiedono terapia sistemica e, viceversa, pazienti con l'interessamento di un singolo organo che necessitano di trattamento urgente [2].

2.1.8.4.1 TRATTAMENTO DELLA MALATTIA ASINTOMATICA

Il trattamento della malattia subclinica può essere necessario, perché si può arrivare ad esiti irreversibili negli organi dove il danno non si rende clinicamente evidente fino agli stadi terminali di malattia.

Il trattamento è, inoltre, giustificato quando indagini di laboratorio o di imaging mostrano la disfunzione d'organo o nel caso di problemi di natura estetica per edema periorbitale o sottomandibolare, ad esempio. Infine, la remissione ottenuta con i farmaci è più rapida e più estesa rispetto a quella che risulta dal “watchful waiting”.

2.1.8.4.2 TRATTAMENTO URGENTE

Si rende necessario un trattamento urgente quando la malattia, se non prontamente trattata, può esitare in un danno d'organo irreversibile. Glucocorticoidi a medio-alto

dosaggio o Rituximab (quando il paziente ha controindicazioni al trattamento con glucocorticoidi) sono i farmaci di scelta in queste situazioni.

2.1.8.4.3 TRATTAMENTO DELLE LESIONI FIBROTICHE

In alcuni casi, la sintomatologia dipende dagli esiti fibrotici della IgG4-RD di lunga data: queste lesioni tendono a rispondere poco a tutti i farmaci a nostra disposizione, tanto da rendere il rapporto rischio-beneficio a sfavore del trattamento. Quando la sede anatomica lo permette, può essere un'opzione il “debulking” chirurgico, come nel caso della mesenterite sclerosante o degli pseudotumori orbitari, dove la chirurgia, se possibile, è il miglior trattamento [18].

2.1.8.4.4 TERAPIA DI MANTENIMENTO E PREVENZIONE DELLE RICADUTE

La validità della terapia di mantenimento con lo scopo di ridurre la frequenza delle ricadute e il danno d'organo è riconosciuta dalla maggioranza degli esperti. Fattori che pongono il paziente ad alto rischio di ricaduta precoce dopo l'induzione della remissione sono: IgG4-RD multiorgano, livelli di IgG4 sieriche molto elevati, coinvolgimento del dotto biliare prossimale e storia di precedenti ricadute [18]. In studi riguardanti la AIP, è stato osservato che la maggior parte delle ricadute (67%) avviene nei soggetti trattati con steroidi che interrompono l'assunzione, mentre solo in minoranza avvengono durante lo scalaggio dello steroide (15%) o in terapia steroidea di mantenimento (18%) [5].

La terapia di mantenimento può essere costituita da steroidi a basso dosaggio o da uno dei farmaci steroid-sparing citati. Rituximab si è rivelato efficace in terapia di mantenimento, ma la frequenza e la durata del trattamento non sono definite chiaramente. Inoltre, Rituximab è stato usato spesso quando c'erano segni di ripresa di malattia.

A prescindere dal farmaco usato, la durata ottimale della terapia di mantenimento non è stata valutata accuratamente, ma, probabilmente, dipende da fattori paziente-specifici.

Linee guida giapponesi per la AIP, raccomandano una terapia di mantenimento con steroidi a basso dosaggio (prednisolone, 2,5-5 mg/day) per i pazienti ad alto rischio di ricaduta. La durata ottimale della terapia non è stata studiata. Studi retrospettivi multicentrici su 459 pazienti con AIP in Giappone mostrano che l'82% dei pazienti hanno fatto terapia steroidea di mantenimento e che i tassi di ricaduta erano significativamente inferiori durante terapia di mantenimento (23% vs 34%).

Nonostante questo, la monoterapia con steroidi è spesso meno efficace di quanto si vorrebbe: il tasso cumulativo di ricadute, dopo l'inizio della terapia, è del 56% a un anno, del 76% dopo 2 anni e del 92% dopo 3 anni.

In più, bisogna considerare che la terapia continuativa con glucocorticoidi per anni, seppur a basso dosaggio, è associata a effetti collaterali, in particolare, in pazienti come questi, che hanno un'età medio-avanzata e frequente interessamento del pancreas a causa della patologia.

2.1.8.4.5 TRATTAMENTO DELLE RICADUTE

Il tasso di ricadute, anche in trattamento, rimane, piuttosto elevato e, come già affermato, una storia di ricaduta appare essere un forte fattore predittivo di una nuova ricaduta in futuro.

La maggior parte dei pazienti risponde bene ai glucocorticoidi per ottenere la re-induzione della remissione. Successivamente, se con un periodo breve di trattamento con steroidi si ottiene una remissione prolungata, si può decidere di ripetere il trattamento con steroidi senza terapie aggiuntive. Altrimenti, si può considerare anche l'introduzione di un farmaco steroideo-risparmiatore per il mantenimento [18].

2.2 ANGIOGENESI

Con il termine angiogenesi si intende il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni da vasi pre-esistenti, strettamente controllato da un delicato equilibrio tra fattori pro-angiogenici ed angiostatici. L'angiogenesi è fondamentale sia in processi fisiologici, quali lo sviluppo fetale, la cicatrizzazione delle ferite ed il ciclo riproduttivo, sia in condizioni patologiche come infiammazione cronica, il rimodellamento tissutale, la fibrosi ed i processi tumorali/metastatici. L'angiogenesi è il risultato di una serie di eventi che si succedono in una sequenza ben programmata. Il primo step è caratterizzato dalla liberazione di mediatori pro-angiogenici (fattori di crescita e metalloproteinasi) da parte di cellule del sistema immunitario (linfociti, monociti e neutrofili) e di cellule strutturali (cellule epiteliali e fibroblasti). Questi fattori promuovono la degradazione della membrana basale endoteliale e lo scollamento dalla parete vascolare di cellule connettivali dette periciti. Tale processo favorisce la successiva migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali ed è regolato da fattori di crescita quali il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ed il Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2). Nell'area perivascolare si viene, quindi, a creare il "primary sprout" o germoglio primario, dal quale si formerà un nuovo capillare ad ansa. Il nuovo vaso necessita di una successiva stabilizzazione, con formazione di una nuova parete da parte dei periciti che si assemblano intorno alle cellule endoteliali a formare una guaina. Una volta che la parete vasale è formata, i fattori angiostatici endogeni vengono rilasciati per controbilanciare i fattori angiogenici ed interrompere il processo di vascolarizzazione. Mentre nei processi fisiologici i fattori angiogenici ed angiostatici sono in equilibrio tra loro, in corso di eventi patologici i fattori angiogenici sembrano prevalere su quelli angiostatici con conseguente formazione di una eccessiva vascolarizzazione [19].

Durante la formazione dei nuovi vasi è possibile riscontrare a livello endoteliale l'attivazione di tali cellule, con liberazione delle forme solubili di molecole di adesione espresse fisiologicamente a livello endoteliale.

Tra le principali molecole di adesione espresse sulle cellule endoteliali, vengono identificate l'ICAM-1 e la VCAM-1.

Tali molecole sono proteine di membrana che permettono ai linfociti di migrare nei

tessuti e negli organi linfatici secondari (homing) attraverso la barriera endoteliale e di raggiungere la zona di infiammazione (diapedesi). Le forme solubili dell' ICAM-1 (sICAM-1) e della VCAM-1 (sVCAM-1) sono il risultato del clivaggio proteolitico di tali molecole di adesione da parte di enzimi proteolitici, per esempio le metalloproteasi della matrice (MMPs).

Le forme solubili sICAM-1 e sVCAM-1 sono attualmente considerate biomarcatori di disfunzione endoteliale e livelli elevati di tali molecole sono, quindi, indicativi di uno stato di infiammazione vascolare e possono essere considerati come indice di aumentato rischio cardiovascolare, oltre che di uno stato di infiammazione generalizzata.

2.2.1 FATTORI PRO-ANGIOGENICI

I fattori che regolano l'angiogenesi vengono in parte rilasciati dalle cellule infiammatorie che infiltrano il tessuto flogistico ed in parte dalle cellule stromali. Tra questi mediatori, ricordiamo i fattori di crescita, le citochine, le chemochine, i componenti della matrice extracellulare (ECM), gli enzimi proteolitici e le molecole di adesione [20]. I fattori di crescita, una volta rilasciati, si legano alla ECM, ai proteoglicani e alle membrane cellulari, dove rimangono legati in forma inattiva. Dopo azione proteolitica da parte di alcune MMPs, questi fattori di crescita vengono liberati e vanno ad attivare le cellule endoteliali e altre cellule tissutali, come le cellule epiteliali e i fibroblasti. A loro volta, tali cellule liberano fattori pro-infiammatori, pro-angiogenici e pro-fibrotici amplificando e cronicizzando i processi di infiammazione e fibrosi.

2.2.1.1 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

Il VEGF è il fattore di crescita endoteliale più importante, con un ruolo prevalentemente mitogenico selettivo per tali cellule. Con il termine VEGF si indica una specifica sottofamiglia di fattori di crescita coinvolta sia nella vasculogenesi (intesa come genesi ex-novo di un sistema circolatorio in età embrionale) sia nell'angiogenesi (la formazione di vasi da strutture già esistenti). La proteina più importante di questa categoria è il VEGF-A, in origine chiamato VEGF prima della

scoperta di altre forme della proteina. La famiglia del VEGF, oltre il VEGF-A include la PlGF (proteina placentare coinvolta nello sviluppo prenatale), il VEGF-B, il VEGF-C ed il VEGF-D. Tutti i membri della famiglia VEGF stimolano risposte cellulari, mediante legame con i recettori tirosin-chinasici espressi sulla superficie della cellula endoteliale. Il legame VEGF-recettore determina la dimerizzazione di quest'ultimo e la sua attivazione tramite transfosforilazione. Il VEGF-A si lega ai recettori VEGFR-1 e VEGFR-2: di questi, il secondo (detto anche recettore funzionale) è quello responsabile della maggior parte delle risposte cellulari indotte dal VEGF. Il primo, meno conosciuto, si pensa svolga un ruolo di modulazione del VEGFR-2. Un'ipotesi recente è che il VEGFR-1 possa agire da inibitore competitivo nei confronti del VEGFR-2, soprattutto in età embrionale [21].

IL VEGF viene sintetizzato principalmente da cellule del sistema immunitario, quali macrofagi e monociti, in risposta allo stimolo di citochine pro-infiammatorie (TNF- α e IL-1). Tramite legame con il VEGFR-2, tale fattore stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, con conseguente formazione di nuovi vasi.

L'ipossia è stata identificata come condizione rilevante nella produzione di VEGF in corso di infiammazione. La riduzione della tensione di ossigeno a carico del tessuto porterebbe all'aumento della produzione di fattori appartenenti alla famiglia degli hypoxia inducible factors (HIF-1 e HIF-2) da parte di cellule infiammatorie, quali macrofagi e monociti, con successiva sintesi di VEGF. Altri meccanismi chiamati in causa nella regolazione della produzione di VEGF sono la sintesi di ossido nitrico (NO) e la produzione di prostaglandine [20, 21].

2.2.1.2 ANGIOGENINA-1 (Ang-1)

L'angiogenina-1 (Ang-1) è una piccola proteina di 123 aminoacidi con un peso molecolare di circa 14,4 KDa. Ha una debole attività come ribonucleasi, ma è essenziale per l'angiogenesi ed altri processi. I meccanismi tramite cui l'Ang-1 induce la formazione di nuovi vasi non è del tutto chiaro, ma essa interagisce con le cellule muscolari lisce e con le cellule endoteliali, inducendo un ampio range di risposte cellulari, tra cui la migrazione, l'invasione nel tessuto, la proliferazione e la formazione di strutture tubulari.

È stato dimostrato che questa molecola svolga un ruolo chiave in diverse patologie

che dipendono fortemente dall'angiogenesi, tra cui i tumori, il diabete, la sclerosi laterale amiotrofica, endometriosi, le malattie infiammatorie croniche dell'intestino, artrite reumatoide e malattie auto-infiammatorie [22].

2.2.2 FATTORI ANGIOSTATICI

Sono state identificate numerose molecole ad azione angiostatica di origine naturale e molte sono state sintetizzate ex-novo. Alcune di esse sono già state proposte come terapia per inibire la neovascolarizzazione durante processi tumorali e/o infiammatori. Gli inibitori endogeni dell'angiogenesi sono proteine o frammenti di proteine prodotte dall'organismo che inibiscono la formazione dei vasi. Esistono almeno 27 diverse molecole con questa funzione e possono essere frammenti di molecole della ECM, frammenti di ormoni, fattori della coagulazione o proteine del sistema immunitario.

2.2.2.1 ENDOSTATINA

L'Endostatina, fattore di inibizione dell'angiogenesi, è stato purificato per la prima volta nel 1997 dall'emangioma di topo; è riconosciuto come antagonista endogeno principale per il VEGF. L'Endostatina è un polipeptide di 184 amminoacidi dal peso molecolare di 20-22 KDa, costituito dal frammento carbossi-terminale del collagene di tipo XVIII (componente della ECM dei vasi sanguigni). L'endostatina inibisce la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali causandone l'arresto cellulare in fase G1 e inducendone l'apoptosi. Tali effetti sono dovuti all'azione di blocco del legame delle isoforme VEGF165 e VEGF121 con il loro recettore funzionale VEGFR-2, e all'inibizione della ciclina D1. Partecipa, inoltre, alla down-regolazione della trasduzione di segnale avviata da TNF- α e Nf κ B e ha un effetto di stabilizzazione sui legami tra cellule-cellule e cellule-matrice.

2.3 FIBROSI

Con il termine fibrosi si intende l'aumento di tessuto connettivo fibroso, ricco di fibre collagene e povero di cellule e vasi. Si verifica per un aumento primitivo delle

cellule del tessuto connettivo (fibroblasti, adipociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce ed istiociti) e delle molecole della matrice extracellulare (collagene, glicoproteine, proteoglicani, elastina) oppure per la risposta di riparazione tissutale attivata a seguito di un danno prolungato o cronico. Queste due situazioni possono coesistere e potenziarsi a vicenda. Le cellule del tessuto connettivo propriamente detto sono i fibroblasti, che producono ECM, sostanza che rappresenta l'asse portante e nutritivo degli altri tessuti. L'1% di queste cellule è costituito da una popolazione staminale in grado di proliferare e differenziarsi in fibrociti maturi (specializzati nella produzione di ECM) o in altre cellule di derivazione connettivale. I segnali proliferativi sono innescati da vari fattori di crescita, tra cui il TGF- β , i FGF, il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) e l'EGF (fattore di crescita dell'epidermide). Tutti questi segnali regolano l'inibizione della proliferazione, la produzione di collagene e altre molecole, la produzione di proteasi (collagenasi, MMPs, serin- e cisteinproteasi, ialuronidasi, plasmina) e dei relativi inibitori tissutali (TIMPs e PAI).

2.3.1 TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1 (TGF- β 1)

Il TGF- β 1 è una delle –almeno– tre isoforme della citochina TGF- β che, a sua volta, fa parte della famiglia dei fattori di crescita trasformante (TGF), insieme al TGF- α .

Il TGF- β 1 è stato caratterizzato come un precursore di 390 aminoacidi che viene processato con taglio proteolitico per ottenere il peptide maturo di 112 aminoacidi. Ha differenti funzioni sui differenti tipi di cellule immunitarie. Il TGF- β 1 inibisce la proliferazione e le funzioni effettrici delle cellule T e ne regola la differenziazione a determinati subset. TGF- β 1 previene infatti l'attivazione dei linfociti T helper e citotossici, inibisce la secrezione di IFN- γ , TNF- α e varie IL, riduce l'espressione dei recettori di alcune IL, ad esempio IL-2. Può, però, aumentare la proliferazione delle cellule T immature e la produzione di alcune citochine. La differenziazione delle cellule T regolatorie FoxP3 positive è TGF- β 1-dipendente ma in combinazione con citochine pro-infiammatorie quali IL-1 e IL-6 promuove lo sviluppo di cellule Th17. Stimola l'apoptosi delle cellule B e ne inibisce la proliferazione. Inibisce, infine, la proliferazione e la produzione di specie reattive dell'ossigeno e di acido nitrico di monociti e macrofagi. Il TGF- β 1 è il principale induttore di differenziazione dei

fibroblasti in miofibroblasti, responsabili della formazione di matrice extracellulare in corso di processi fibrotici.

2.3.2 STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 (SDF-1)/CXCL12

Il fattore derivato dalle cellule stromali (SDF-1), conosciuto anche come CXCL12 è una chemochina espressa in maniera ubiquitaria in molti tessuti e cellule. Fa parte della sottofamiglia CXC, dove i due ponti disolfuro formati dai 4 residui di Cisteina caratteristici delle chemochine sono separati da un aminoacido. È estremamente chemotattico per i linfociti e stimola l'espressione del CD20 sulle cellule B. Durante l'embriogenesi, dirige la migrazione di cellule ematopoietiche dal fegato fetale e dal midollo osseo per la formazione dei grossi vasi. È chemotattico anche per le cellule staminali mesenchimali e risulta espresso nelle sedi di danno osseo, dove inibisce l'osteoclastogenesi. Svolge un ruolo importante nell'angiogenesi, dato che stimola la migrazione delle cellule progenitrici delle cellule endoteliali grazie al legame con CXCR4. SDF-1 si lega infatti al CXCR4 e recentemente è stato ipotizzato un suo legame anche al CXCR7. In letteratura viene riportato il ruolo di questa chemochina nello sviluppo e progressione di diversi tumori (pancreas, prostata, melanoma, mammella). L'asse SDF-1/CXCR4 gioca un ruolo importante nell'angiogenesi e nella fibrosi ed è coinvolto in molti processi patologici, induzione della migrazione delle cellule che esprimono il recettore CXCR4 verso le zone danneggiate per la riparazione tissutale.

2.4 ANGIOGENESI E FIBROSI NELLA IgG4-RD

La fibrosi è un dei tre aspetti istopatologici diagnostici della IgG4-RD. In corso di tale patologia la fibrosi presenta un tipico pattern storiforme con miofibroblasti e fibroblasti che si irradiano verso la periferia (aspetto "a ruota di carro").

Il TGF- β risulta essere fondamentale nella genesi della fibrosi della IgG4-RD insieme ad altri fattori pro-fibrotici quali la periostina. Nel tessuto delle ghiandole salivari di pazienti con sialoadenite IgG4-RD sia il TGF- β che la periostina risultano aumentati. Tali fattori sono distribuiti non solo nella capsula interlobare come accade nella sialoadenite cronica, ma anche attorno alle cellule acinari danneggiate e alle

cellule duttali. La periostina sembra contribuire alla formazione del tessuto fibrotico e la sua deposizione a livello del tessuto ghiandolare sembra essere secondaria all'aumento del TGF- β [23] prodotto soprattutto dalle cellule T citotossiche (CTL CD4+ SLAMF7+) [7].

Mentre la deposizione di TGF- β e' stata riportata nel tessuto ghiandolare dei pazienti con IgG4-RD, i livelli di tale fattore pro-fibrogenico in circolo non sono stati fino ad ora valutati. In parallelo ai fattori pro-fibrotici, non sono stati fino ad ora riportati studi su pazienti IgG4-RD relativi alla determinazione in circolo di fattori che regolano l'angiogenesi.

I processi che regolano la fibrosi e l'angiogenesi sono spesso strettamente correlati, anche perché la formazione di nuovi vasi a partire dai vasi preesistenti è una tappa fondamentale durante la fibrosi. A conferma di tale relazione, è stato dimostrato che fattori pro-fibrogenici, quali per esempio il TGF- β , regolano la formazione di nuovi vasi attraverso la produzione di VEGF e FGF-2 da parte di cellule strutturali. L'aumento di TGF- β e periostina nel tessuto ghiandolare dei pazienti con IgG4-RD può quindi essere responsabile della produzione di VEGF [23].

Non sono stati riportati in letteratura studi sul potenziale ruolo di fattori angiostatici nella IgG4-RD. L'endostatina, principale fattore di inibizione endogeno del VEGF, non è stato valutato in corso di IgG4-RD né a livello tissutale né in circolo.

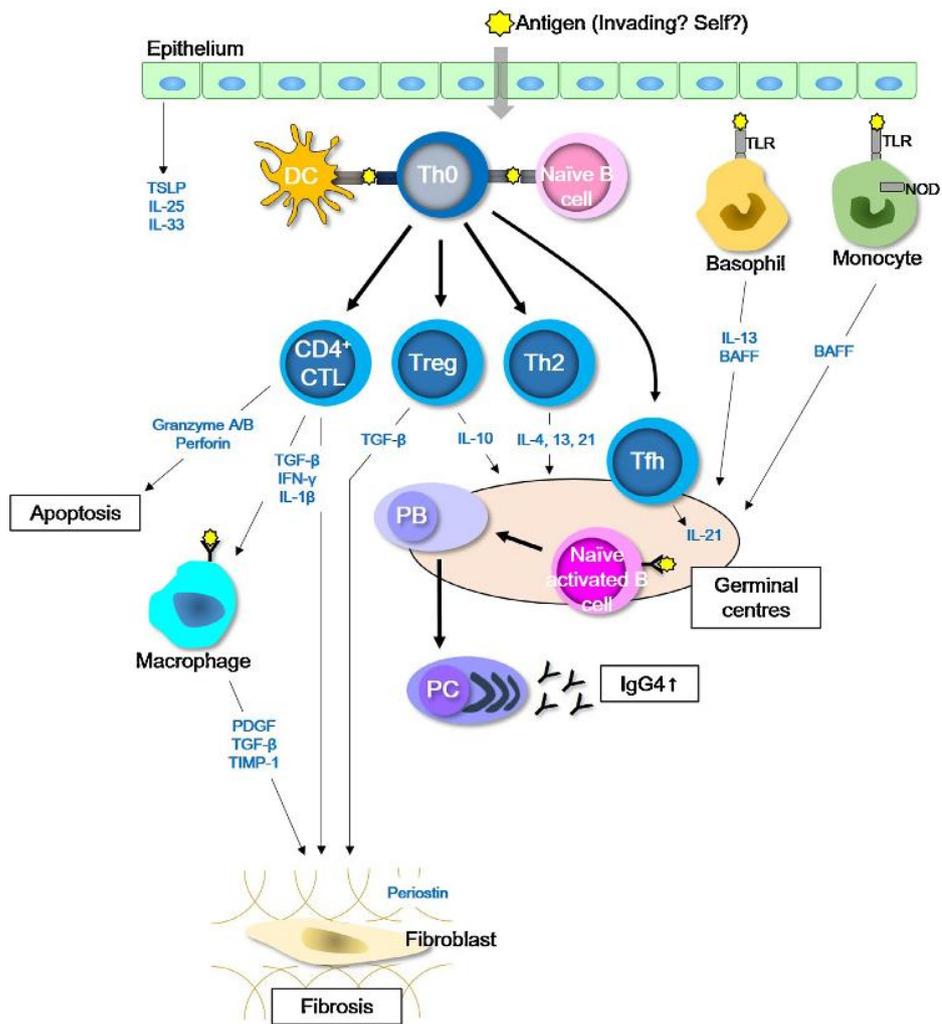


Figura 23 Meccanismi patogenetici coinvolti nella fibrosi IgG4-RD [24]

3 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo dello studio è quello di valutare in pazienti con malattia da IgG4 i livelli sierici di fattori che regolano l'angiogenesi (VEGF, Ang-1, Endostatina) e la fibrosi (TGF- β 1, SDF-1). Abbiamo, inoltre, valutato i livelli delle molecole di adesione solubili ICAM-1 (sICAM-1) e VCAM-1 (sVCAM-1), marcatori di disregolazione endoteliale e abbiamo correlato i risultati ottenuti con i principali parametri sierologici e clinici della malattia.

4 PAZIENTI E METODI

4.1 PAZIENTI

Abbiamo selezionato presso l'U.O. di Immuno-Allergologia Clinica di Pisa 15 pazienti con malattia da IgG4 in cui la diagnosi è stata formulata nel periodo compreso tra Giugno 2015 e Dicembre 2016 sulla base dei criteri di Umehara, che tengono conto della clinica, dei livelli di IgG4 sieriche e dei dati istologici [15].

Sono stati valutati i seguenti parametri: presenza di tumefazioni linfonodali, ghiandolari (salivari, lacrimali, tiroide, e prostata) e orbitarie, presenza di lesioni cutanee, segni e sintomi di interessamento addominale (pancreas, fegato, milza, vie biliari e peritoneo), respiratorio, cardiocircolatorio e del SNC.

Come parametri sierologici sono stati valutati i livelli delle IgG totali e delle sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), il rapporto IgG4/IgG totali, IgE totali, IgA ed IgM; quantità di proteine totali e dell'elettroforesi delle sieroproteine, fattore reumatoide, anticorpi anti-nucleo e complemento (C3 e C4); gli indici di flogosi (VES e PCR), il numero di eosinofili periferici (in valore assoluto) e conta leucocitaria. Abbiamo inoltre valutato la funzione renale misurando i livelli di creatinina sierica.

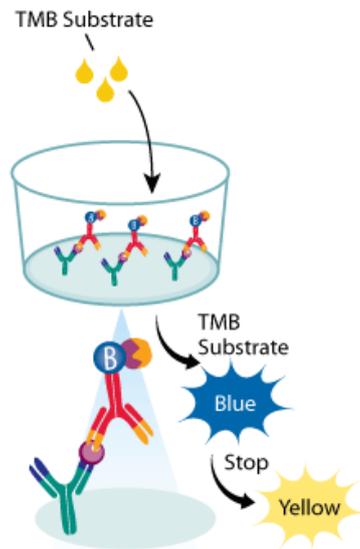
I pazienti sono stati sottoposti ad indagini strumentali: ecografia dell'addome, delle stazioni linfonodali, della tiroidea, delle ghiandole salivari (maggiori e minori), TC addome, TC torace ad alta risoluzione (HRCT), RMN encefalo. Al fine di indagare le caratteristiche funzionali degli organi e degli apparati potenzialmente coinvolti, i pazienti sono stati sottoposti a indagine PET (Positron Emission Tomography). Poiché le caratteristiche morfologiche dell'organo interessato sono la base fondamentale per la diagnosi della IgG4-RD, i pazienti sono stati sottoposti ad indagine biptica dell'organo interessato con successiva colorazione immunoistochimica per le IgG4 e l'infiltrato plasmacellulare.

4.2 METODI

Una volta ottenuto il consenso informato, tutti i pazienti con diagnosi di malattia da IgG4 sono stati sottoposti ad un prelievo di 4 ml di sangue venoso periferico. Dopo

separazione mediante centrifugazione a 2000 rpm per 10 minuti, il siero ottenuto è stato congelato a -20 °C per dosare i fattori angiogenici/angiostatici, fibrogenici e le forme solubili delle molecole di adesione. I donatori sani (NHS) provenienti dal centro trasfusionale dall'AOUP sono stati inclusi come controlli.

Il dosaggio dei mediatori sierici (VEGF, Ang-1, Endostatina, TGF- β 1, SDF-1, sICAM-1 e sVCAM-1) dei pazienti e dei controlli è stato eseguito mediante analisi quantitativa "sandwich ELISA" (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), come da protocollo. In particolare, il test prevede l'analisi quantitativa di citochine e fattori di crescita utilizzando una piastra da 96 pozzetti. Il primo step prevede l'incubazione sulla superficie della piastra di un anticorpo monoclonale di topo diretto verso la molecole da dosare. Dopo 18 ore di incubazione a temperatura ambiente, la piastra è stata lavata tre volte con PBS contenente 0,05% Tween 20 per eliminare l'eccesso di anticorpo. La piastra è stata quindi saturata con PBS contenente 1% di albumina sierica bovina (BSA) per un'ora a temperatura ambiente. Per la valutazione quantitativa è stato necessario preparare la curva standard utilizzando una quantità nota dell'antigene ricombinante da dosare. La curva comprende 7 concentrazioni scalari dell'antigene ricombinante. Come controllo negativo è stato utilizzato un campione in cui l'antigene è stato omissso. Dopo un ulteriore lavaggio, i pozzetti sono stati caricati in duplicato o con siero di pazienti con malattia da IgG4 e NHS opportunamente diluito in BSA 1%, oppure con i sieri di controlli o con la curva standard. Dopo 2 ore di incubazione, l'eccesso di antigene è stato eliminato mediante lavaggi con PBS, Tween 0,05% e la piastra è stata incubata con un anticorpo secondario (anticorpo policlonale, legato alla biotina e diretto verso gli antigeni umani da dosare). Successivamente, dopo aver lavato l'anticorpo secondario in eccesso, i pozzetti sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con la streptavidina coniugata con perossidasi di rafano diluita 1/200. La reazione è stata sviluppata mediante incubazione per 20 minuti con il substrato Tetra Metil Benzidina (TMB- Sigma-Aldrich). La reazione enzimatica è stata successivamente bloccata con H₂SO₄ (2N) e la piastra è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda (OD) di 450 nm. La quantità di antigene è stata ottenuta sulla base dei valori della curva standard calcolata utilizzando il programma Excel.



Nel test sandwich-ELISA, le molecole da dosare (VEGF, Angiogenina-1, Endostatina, TGF- β 1, SDF-1, sICAM-1, VCAM-1) funzionano da “ponte”: maggiore è la quantità di antigene presente nei campioni, maggiore sarà la densità ottica rilevata dallo spettrofotometro. Questa metodica è altamente specifica poiché vengono ridotte le possibili cross-reattività od interferenze con altre isoforme dei mediatori dosati.

Per il dosaggio sierico del VEGF, Ang-1, TGF- β 1, SDF-1, sICAM-1 e sVCAM-1 nei soggetti con malattia da IgG4 e nei controlli sani sono stati utilizzati kit QuantikineELISA prodotti dall’R&D system (catalog number: VEGF DVE00, Ang-1 DAN00, TGF- β 1 DB100B, SDF-1 DSA00, sICAM-1 DCD540, sVCAM-1 DVC00). Per l’Endostatina è stato utilizzato ELISA kit Duo-Set prodotto sempre dall’R&D system (catalog number DY 1098).

4.2.2 ANALISI STATISTICA

I dati relativi ai dosaggi di VEGF, Ang-1, Endostatina, TGF- β 1, SDF-1, sICAM-1 e sVCAM-1 sono espressi come media \pm deviazione standard di ogni campione valutato in duplicato. Per lo studio statistico è stato utilizzato il Software GraphPad ed il programma GraphPad Prism 5 per l’analisi dei dati. I dati dei 2 gruppi (patologici e normali) sono stati analizzati mediante il test non parametrico di Mann-Whitney. La probabilità inferiore a 0.05 è stata considerata statisticamente significativa. Per le analisi di correlazione tra livelli sierici dei mediatori dosati e i parametri clinici è stato utilizzato il test di correlazione non parametrico (Spearman’s test).

5 RISULTATI

5.1 CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PAZIENTI CON IGG4-RD

Abbiamo selezionato 15 pazienti con diagnosi di IgG4-RD presso l'U.O. di Immuno-Allergologia Clinica di Pisa [età media: 59 (27-79), M/F: 7/8]. Lo spettro di organi coinvolti dalla malattia nei nostri pazienti è piuttosto ampio e i più colpiti sono: stazioni linfonodali (6/15 pazienti), le ghiandole salivari (5/15 pazienti), retroperitoneo, mesentere e mediastino (considerati come un'unica categoria) (5/15 pazienti). Gli altri organi interessati sono stati, in ordine di frequenza: pancreas (3/15), aorta e grossi vasi (3/15), meningi (2/15), fegato e vie biliari (2/15), tiroide (1/15), cute (1/15), ipofisi (1/15), polmone (1/15). La maggioranza dei pazienti (64,29%) presentava interessamento di almeno 2 organi, con una media di 2,1 organi colpiti (range 1-5 organi).

5.2 CARATTERISTICHE SIEROLOGICHE DEI PAZIENTI CON IGG4-RD

Per quanto riguarda il dosaggio sierico delle IgG4, queste sono risultate elevate (>135 mg/dL) nel 71,4% dei pazienti, con un valore medio di 395,37 mg/dL (range 13-2790 mg/dL). Il rapporto IgG4/IgG medio tra i pazienti è di 17,54 (range 1,66-60,12).

I livelli di IgG totali sono risultati normali nell'85% dei pazienti con un valore medio di 1586,14 mg/dL (range 780-4640 mg/dL). Le altre sottoclassi di IgG sono normali nella maggioranza dei pazienti [IgG1: media 751,35 mg/dL (range 462-1370 mg/dL), normali nel 79%; IgG2: media 393,78 mg/dL (range 208-755 mg/dL) normali nel 92%; IgG3: media 45,42 mg/dL (range 15-105 mg/dL) normali nell'85% dei pazienti].

Il 70% dei pazienti presentava un aumento della VES (valore medio 29,2 mm/ora; range 3-100 mm/ora) ed il 58% un valore elevato di PCR (valore medio: 1,15 mg/L; range 0-6,63 mg/L). La valutazione del numero degli eosinofili periferici ha mostrato nel 25% dei pazienti un lieve aumento (range 450-1500 eosinofili/ μ L). Le IgE totali erano elevate nel 20% dei soggetti (valore medio 664,7 KU/L; range 16-4320 KU/L).

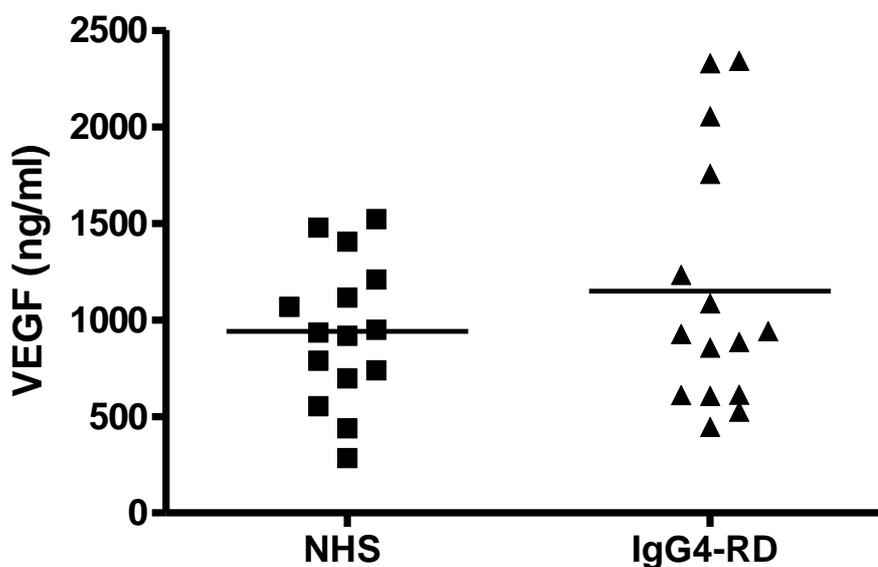
Sulla base delle IgG4 sieriche e dell'interessamento d'organo, è stato calcolato il responder index (IgG4-RD RI), assegnando uno score ad ogni organo colpito e alle IgG4 sieriche come riportato da Mollie et al [25]. Nei nostri pazienti, il IgG4-RD RI varia tra 1 e 15, con un valore medio di 7,4.

5.3 VALUTAZIONE DEI FATTORI CHE REGOLANO L'ANGIOGENESI NELLA IgG4-RD

Tra i fattori che regolano l'angiogenesi abbiamo valutato in circolo i livelli dei 2 principali fattori pro-angiogenici (VEGF ed Ang-1) e del principale fattore angiostatico (Endostatina). L'analisi dei livelli sierici di VEGF (**Figura 1A**) ed Ang-1 (**Figura 1B**) nei nostri pazienti non ha dimostrato differenze significative rispetto ai controlli sani. Si evidenzia comunque un'alta variabilità dei valori di VEGF nel gruppo dei pazienti.

Per quanto riguarda, invece, i livelli di fattori angiostatici, l'endostatina si è rivelata essere aumentata in maniera significativa ($P < 0,0001$) nei soggetti affetti da IgG4-RD (**Figura 1C**) e correlare positivamente con l'indice di attività di malattia ($r = 0,5842$; $P = 0,0360$).

Figura 1A



5.4 VALUTAZIONE DEI FATTORI FIBROGENICI NELLA IgG4-RD

Tra i fattori che regolano la fibrosi abbiamo valutato i livelli di TGF- β 1, il principale fattore pro-fibrogenico dimostrato essere sovra espresso nel tessuto ghiandolare dei pazienti con IgG4-RD. In parallelo abbiamo dosato nello stesso gruppo di pazienti un altro fattore pro-fibrogenico, SDF-1 rilevante anche nei processi angiogenici. L'analisi dei livelli sierici del TGF- β 1 non rileva differenze significative tra il gruppo dei pazienti con IgG4-RD e il gruppo di controllo (**Figura 2A**), anche se è possibile osservare una maggiore dispersione dei valori di TGF- β 1 nel gruppo patologico rispetto a quello di controllo. L'analisi dei livelli di SDF-1 ha invece rilevato un aumento statisticamente significativo nel gruppo patologico rispetto al gruppo di controllo ($P=0,0034$) (**Figure 2B**).

Figura 2A

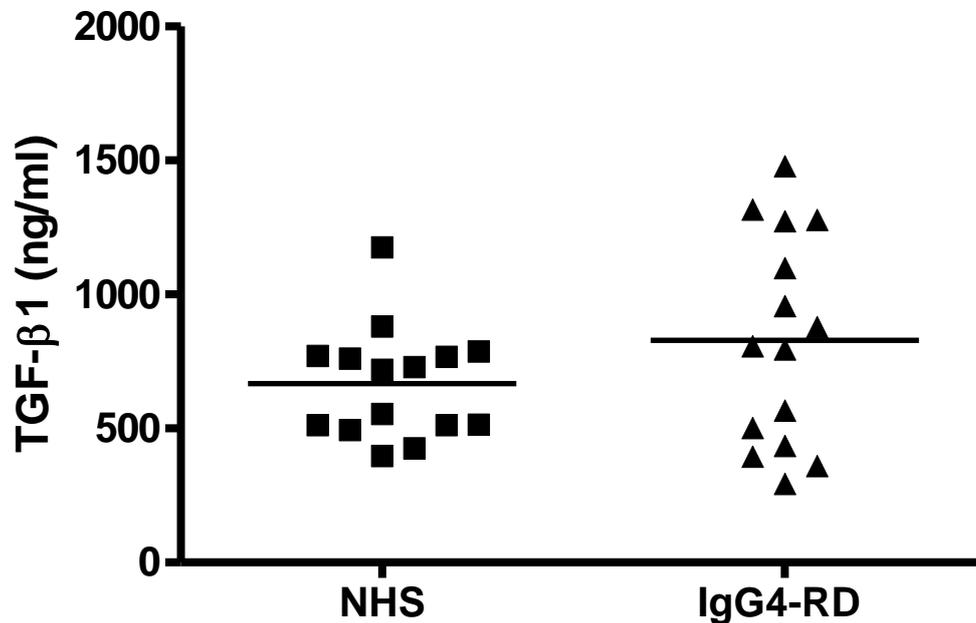
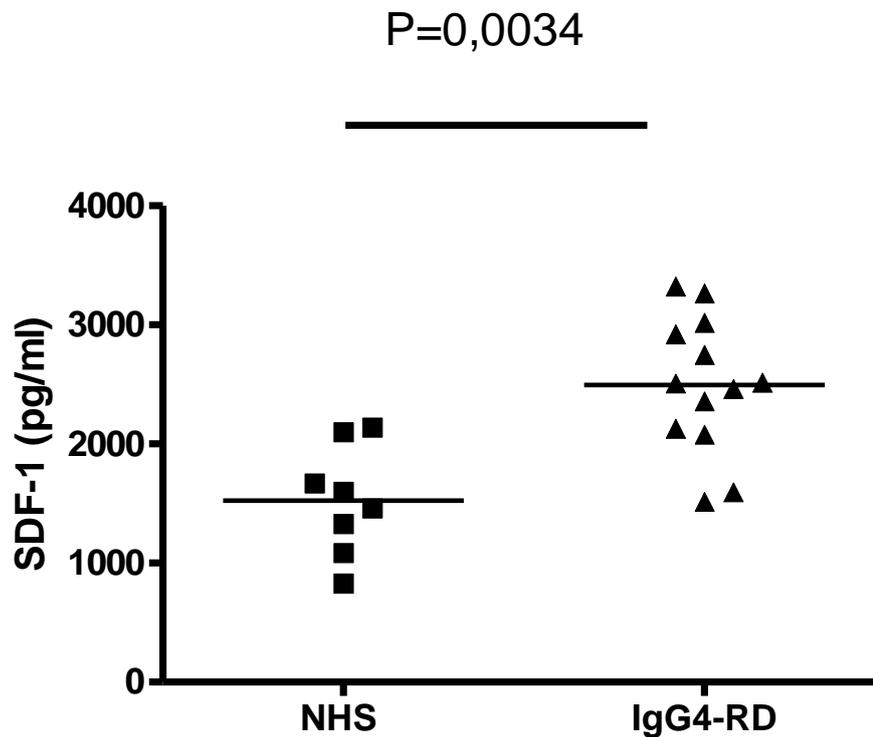


Figura 2B

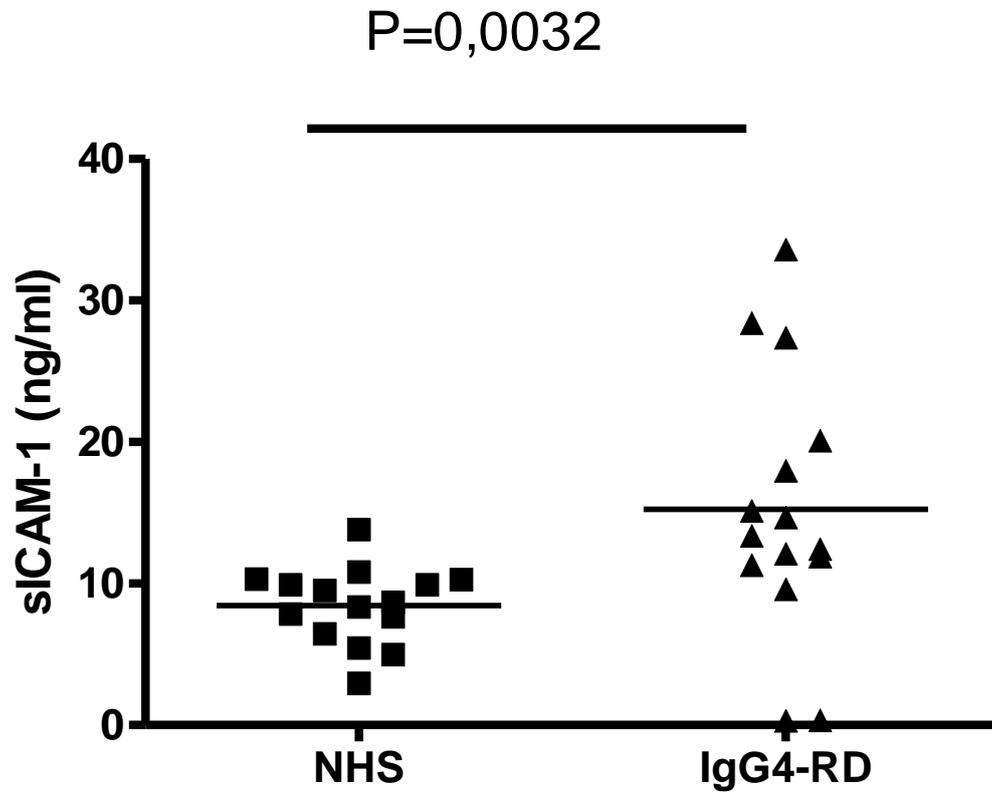


5.5 VALUTAZIONE DEGLI INDICATORI DI DISREGOLAZIONE ENDOTELIALE NELLA IgG4-RD

Oltre i livelli dei fattori che regolano l'angiogenesi e la fibrosi, abbiamo valutato eventuali differenze tra IgG4 e controlli dei marcatori di disregolazione endoteliale. In particolare abbiamo valutato i livelli di sICAM-1 e sVCAM-1.

Analisi statistica ha rilevato un aumento significativo di sICAM-1 nel gruppo patologico rispetto al gruppo di controllo ($P=0,0032$) (**Figura 3**), a differenza dei livelli di sVCAM-1 risultati sovrapponibili tra i due gruppi analizzati. Nei pazienti con IgG4-RD i livelli sierici di sICAM-1 correlano positivamente con il numero di eosinofili periferici ($r=0,6095$; $P=0,0354$).

Figura 3



6 DISCUSSIONE

La malattia da IgG4 è una malattia fibroinfiammatoria ad eziologia sconosciuta, in cui non è noto il ruolo patogenetico di un alterato controllo dei meccanismi di angiogenesi e di regolazione dell'attività fibroblastica. In questo studio abbiamo quindi analizzato i livelli sierici di alcuni mediatori pro-angiogenici ed angiostatici e di alcune citochine e chemochine che svolgono un ruolo importante nei processi fibrotici.

Per quanto riguarda i mediatori implicati nell'angiogenesi, i soggetti affetti da malattia da IgG4 hanno livelli dei mediatori pro-angiogenici VEGF e angiogenina del tutto sovrapponibili ai controlli sani. Sono invece nettamente aumentati i livelli del mediatore angiostatico endostatina. L'endostatina è un frammento della parte C-terminale del collagene XVIII; l'azione anti-angiogenica e l'azione anti-fibrotica sembrano risiedere in 2 porzioni distinte della molecola, l'amino-terminale e la carbossi-terminale, rispettivamente [26]. Al momento, però, è stato proposto l'uso dell'endostatina ricombinante "intera" come terapia anti-tumorale o anche come trattamento anti-fibrotico [27].

In condizioni fisiologiche, i livelli di endostatina aumentano con l'età ed è stato suggerito che ciò contribuisca al controllo della crescita di cellule trasformate. L'esposizione prolungata ad alti livelli di endostatina sarebbe però responsabile della rarefazione vascolare con fibrosi che si osserva nell'invecchiamento; dati a supporto di questa interpretazione sono stati ottenuti in modelli animali in cui endostatina e transglutaminasi 2 sarebbero responsabili di fibrosi a livello renale [28].

In condizioni patologiche caratterizzate da fibrosi, quali la sclerosi sistemica o la fibrosi polmonare idiopatica, si riscontra un aumento dei livelli di endostatina. Nella fibrosi polmonare i livelli di endostatina sono paralleli all'aumento di citochine pro-infiammatorie e di metalloproteinasi 3 e negativamente correlati con parametri di funzionalità polmonare, quali la capacità vitale forzata e la diffusione gassosa. L'effetto pro-apoptotico dell'endostatina su cellule epiteliali polmonari può rappresentare un importante contributo ai meccanismi di malattia, limitando la capacità di riparazione dell'epitelio [29]. Nella sclerosi sistemica, è stato osservato un aumento dei livelli sistemici dell'endostatina, correlato con la severità della fibrosi a livello cutaneo e polmonare.

In queste condizioni morbose, e anche nella malattia da IgG4, l'aumento dei livelli di endostatina potrebbe dipendere da un'aumentata produzione legata all'iperattività delle metalloproteasi che si osserva in tutti i processi fibrotici. L'aumento dei livelli di endostatina può rappresentare un meccanismo di compenso, indipendente dall'attività anti-angiogenica ma invece legato all'attività anti-fibrotica. A supporto di questa interpretazione sono da un lato la normalità dei livelli di fattori pro-angiogenici, e dall'altro l'esistenza di una correlazione positiva tra livelli di Endostatina e indice di attività di malattia.

Tra i possibili mediatori coinvolti nei processi fibrotici, abbiamo analizzato il TGF- β 1 e SDF-1. I livelli di TGF- β 1 nel sangue circolante sono risultati simili nei pazienti rispetto ai controlli: questo non esclude un ruolo della citochina nella fibrosi della malattia da IgG4 (peraltro supportato dalla sua presenza nelle lesioni), ma preclude la possibilità di utilizzarlo come biomarker nella diagnosi o nel follow up.

SDF1/CXCL12 è una chemochina che svolge un ruolo critico nell'omeostasi tissutale e nella risposta infiammatoria, regolando la migrazione di cellule staminali midollari nel sangue periferico e il passaggio di linfociti, monociti e soprattutto neutrofili nei tessuti. Livelli elevati della chemochina sono stati osservati nella fibrosi polmonare e nella displasia broncopolmonare, malattia caratterizzata da un aberrante remodeling del parenchima polmonare, in entrambe le malattie associata ad un numero elevato di fibrociti circolanti [30,31]. I fibrociti sono una popolazione di cellule progenitrici mesenchimali, implicati nella riparazione del danno e nel remodeling tissutale, ma anche capaci di presentare antigeni e di influenzare attraverso le citochine che producono le cellule dell'immunità innata e adattative. Il loro ruolo principale è però il controllo della fibrogenesi in molte malattie sistemiche e organo-specifiche [32]. I fibrociti esprimono CXCR4 e CCR7, recettori di CXCL12, e la loro migrazione nei tessuti, dove evolvono a miofibroblasti, sembra essere guidata proprio da questa chemochina. L'aumento di CXCL12 nei pazienti studiati può quindi essere espressione del meccanismo patogenetico di base della malattia da IgG4.

Oltre i fattori che regolano la fibrosi e l'angiogenesi, abbiamo valutato nei sieri dei pazienti IgG4-RD la forma solubile dell'ICAM-1 e dell'VCAM-1. Tali mediatori vengono spesso dosati per valutare la disfunzione endoteliale per esempio in corso di

infiammazione generalizzata, infiammazione cronica sia su base allergica [33] che infettiva [34], in corso di orticaria cronica [35] ed in corso di patologie cardiovascolari [36].

Nei pazienti IgG4-RD abbiamo riscontrato in circolo un aumento significativo di sICAM-1 rispetto al gruppo di controllo, che potrebbe essere giustificato dallo stato infiammatorio generalizzato. Non abbiamo però osservato correlazione tra i livelli di tale mediatore e gli indici di infiammazione (VES e PCR). Poiché la IgG4-RD è prevalentemente una patologia su base fibrotica, possiamo ipotizzare un ruolo della sICAM-1 in corso di fibrosi. Dati a supporto di questa interpretazione sono stati ottenuti in modelli murini di fibrosi polmonare in cui i livelli di sICAM-1 erano fortemente correlati con l'estensione della fibrosi polmonare [37]. Recentemente Okuda et al hanno osservato un aumento della sICAM-1 in corso di fibrosi polmonare idiopatica nell'uomo e hanno proposto tale mediatore come utile indicatore di esacerbazione della fibrosi polmonare e potenziale marcatore da utilizzare per la diagnosi di malattia [38].

6.1 CONCLUSIONI

Nel complesso, i dati ottenuti in questo lavoro consentono di identificare nell'endostatina un potenziale biomarker di attività di malattia e in SDF-1/CXCL12 un mediatore coinvolto nella fibrogenesi. È stato dimostrato in un modello di danno epatico acuto e cronico, che un alterato rapporto tra l'espressione dei 2 recettori della chemochina, CXCR4 e CXCR7, sposta l'equilibrio da un processo riparativo del parenchima ad un processo fibrotico [39]. È possibile, e dovrebbe essere oggetto di studio, che anche nella malattia da IgG4 il tipo e la gravità dell'impegno d'organo dipendano da un alterato equilibrio fra produzione di SDF-1/CXCL12 e i livelli di espressione dei suoi recettori.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Stone JH, *IgG4-related disease: pathophysiologic insights drive emerging treatment approaches*, Clinical and Experimental Rheumatology, 2016;34 (Suppl. 98):S00-S00.
2. Stone JH, Zen Y, Desphande V, *IgG4-Related Disease*, The New England Journal of Medicine, 2012;366:539-551.
3. Martínez-Valle F et al, *IgG4-related disease: Evidence from six recent cohorts*, Autoimmunity Reviews, 2016.
4. Brito-Zerón P et al, *The clinical spectrum of IgG4-related disease*, Autoimmunity Reviews, 2014;143:1203-1210.
5. Okazaki K, Uchida K, *Autoimmune Pancreatitis The Past, Present, and Future*, Pancreas, 2015;44:1006–1016.
6. Mahajan VS et al, *IgG4-Related Disease*, Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2014;9:315–347.
7. Mattoo H et al, *Clonal expansion of CD41 cytotoxic T lymphocytes in patients with IgG4-related disease*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016.
8. Della Torre E, Lanzillotta M, Doglioni C, *Immunology of IgG4-related disease*, Clinical & Experimental Immunology, 2015;181[2]:191–206.
9. Stone JH et al, *Diagnostic Approach to the Complexity of IgG4-Related Disease*, Mayo Clinic Proceedings, 2015;90:927-939.
10. Maleszewski JJ et al, *IgG4-related disease of the aortic valve: A report of two cases and review of the literature*, Cardiovascular Pathology, 2015;24:56-59.
11. Stone JH, *IgG4-related disease: nomenclature, clinical features, and treatment*, Seminars in Diagnostic Pathology, 2012;29:177-190.
12. Umehara H et al, *IgG4 related disease*, Springer Japan, 2014.
13. Wallace ZS et al, *Predictors of disease relapse in IgG4-related disease following rituximab*, Rheumatology, 2016;55[6]:1000-8.
14. Desphande V et al, *Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease*, Modern Pathology, 2012;25:1181–1192.
15. Umehara H et al, *Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD)*, Modern Rheumatology, 2012;22:21–30.

16. Bateman AC, Culver EL, *IgG4-related disease – Experience of 100 consecutive cases from a specialist centre*, 2016.
17. Khosroshahi A, Stone JH, *Treatment approaches to IgG4-related systemic disease*, *Current Opinion in Rheumatology*, 2011;23: 67–71.
18. Khosroshahi A et al, *International Consensus Guidance Statement on the Management and Treatment of IgG4-Related Disease*, *Arthritis & Rheumatology*, 2015.
19. Koch AE, Distler O, *Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis*, *Arthritis Research & Therapy*, 2007; 9 Suppl 2:S3.
20. Szekanecz Z et al, *New insights in synovial angiogenesis*, *Joint Bone Spine*, 2010;77[1]:13-9.
21. De Paulis A et al, *Expression and function of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils*, *The Journal of Immunology*, 2006;177:7322-7322.
22. Gao X, Xu Z, *Mechanisms of action of angiogenin*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2008:619-624.
23. Ohta N, *Expressions and Roles of Periostin in Otolaryngological Diseases*, *Allergology International*, 2014;63:171-180.
24. Takano K et al, *Recent advances in knowledge regarding the head and neck manifestations of IgG4-related disease*, *Auris Nasus Larynx*, 2016.
25. Mollie N et al, *Development of an IgG4-RD Responder Index*, *International Journal of Rheumatology Volume 2012*, 2012.
26. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA, *Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators*, *Frontiers in Pharmacology*, 2014, 27;5:123.
27. Chen J et al, *Endostar, a novel human recombinant endostatin, attenuates liver fibrosis in CCl4-induced mice*, *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 2014;239(8):998-1006.
28. Lin CH et al, *Endostatin and transglutaminase 2 are involved in fibrosis of the aging kidney*, *Kidney International*, 2016;89(6):1281-92.
29. Richter AG et al, *Soluble endostatin is a novel inhibitor of epithelial repair in idiopathic pulmonary fibrosis*, *Thorax*, 2009;64(2):156-61.

30. Mehrad B et al, *Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007; 353:104–8.
31. Li C, Li X, Deng C, Guo C, *Circulating Fibrocytes Are Increased in Neonates with Bronchopulmonary Dysplasia*, PLoS One, 2016;11(6):e0157181.
32. Bucala R, *Fibrocytes and fibrosis*, The Quarterly journal of medicine, 2012; 105:505–508.
33. Ciebiada M, Barylski M, Gorska Ciebiada M, *Nasal eosinophilia and serum soluble intercellular adhesion molecule 1 in patients with allergic rhinitis treated with montelukast alone or in combination with desloratadine or levocetirizine*, American Journal of Rhinology and Allergy, 2013;27(2):e58-62.
34. Magda KE et al, *sTNFR-II and sICAM-1 are associated with acute disease and hepatic inflammation in schistosomiasis japonica*, International Journal for Parasitology, 2008;38(6):717-23.
35. Puxeddu I et al, *CCL5/RANTES, sVCAM-1, and sICAM-1 in chronic spontaneous urticaria*, International Archives of Allergy and Immunology, 2013;162(4):330-4.
36. Dessein PH, Barry IJ and Sham S, *Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis*, Arthritis Research & Therapy, 2005;7(3):R634-43.
37. Fernandez IE, *Systematic phenotyping and correlation of biomarkers with lung function and histology in lung fibrosis*, American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2016;15;310(10):L919-27.
38. Okuda 2015, *Soluble intercellular adhesion molecule-1 for stable and acute phases of idiopathic pulmonary fibrosis*, Springerplus, 2015;4:657.
39. Ding BS et al, *Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis*, Nature, 2014;505(7481):97-102.

Ringraziamenti

Da sola non ce l'avrei mai fatta. Intendo, quindi, ringraziare chi è stato con me in questa maratona.

La prima persona che voglio ringraziare è la Professoressa Paola Migliorini, che mi ha subito fatto sentire a mio agio e che da qualche anno ormai mi ispira con il suo lavoro e con la sua padronanza, mai ostentata.

Un ringraziamento speciale va alla Dottoressa Ilaria Puxeddu, che ama essere chiamata semplicemente Ilaria: mi ha introdotto al laboratorio in modo pratico, senza sottolineare mai la mia inesperienza e mi ha fatto sentire parte del gruppo, come una risorsa e non come un peso.

Un grazie sentito va a Fiorella, Francesca, Riccardo e Rocco: mi avete rassicurato, aiutato e consigliato quando ne avevo bisogno, per scrivere questa tesi e per ambientarmi. Se ho percepito serenità e disponibilità è soprattutto grazie a voi.

Il ringraziamento più grande va alla mia famiglia.

Ai miei genitori, che vengono prima di tutto. Mi avete sempre sostenuto nelle mie scelte e cresciuto secondo 3 principi: rispetto, umiltà, dignità. Percepire che siete orgogliosi di me è la cosa più bella. Non so se riuscirò mai a dirvelo, ma vi voglio bene.

A mio fratello, una persona unica, un complice che sa farmi "accelerare" quando è il momento di farlo. Sei lo stimolo più grande per me per essere una persona migliore.

A Sara, sempre comprensiva e positiva: una sorella acquisita, e non potevo sperare di meglio.

Alla nonna che non ho mai visto, ma che conosco ogni giorno grazie alle parole di mamma; ai nonni che ho visto ogni giorno e che mi hanno fatto capire quanto sia importante tenere la mano alle persone fino alla fine; al mio supernonno, la persona più positiva che conosca.

Ai miei zii e cugini: ogni anno aspetto i giorni di festa solo per passare un po' di tempo con voi e ridere insieme.

Agli Amici, vecchi e nuovi, che sono la mia famiglia acquisita. A voi va un enorme grazie per ogni volta che mi avete sopportato, per gli sguardi, i sorrisi, le risate, le vacanze, le cene, i pranzi e le colazioni, gli abbracci, le chiacchierate, i messaggi, le chiamate, le giornate passate a comprarci i regali di Natale. Ogni momento passato insieme, ogni gioia o momento difficile condivisi mi hanno dato la carica quando ne avevo bisogno.

A Gianluca va il ringraziamento più dolce: mi ha reso migliore, più forte ed equilibrata e più sicura di quello di cui sono capace. Non mi sento di esagerare dicendo che senza di lui il mondo sarebbe un posto peggiore: sicuramente è così per il mio mondo. Insieme siamo invincibili.

Semplicemente, a tutti voi dico grazie di esserci per me.

Francesca