



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Dottorato di Ricerca In Morfologia e Morfogenesi Umana

Ciclo XXVI

**CARATTERIZZAZIONE DEL TOPO  $\mu$ PAR KNOCKOUT  
COME POSSIBILE MODELLO ANIMALE DI SCLEROSI  
SISTEMICA**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/16

**Dottorando**

Dott.ssa Irene Rosa

**Tutore**

Prof.ssa Lidia Ibba Manneschi

**Coordinatore**

Prof. Persio Dello Sbarba

Anni 2011/2013

# INDICE

<b><u>INTRODUZIONE</u></b>	1
<b><i>La sclerosi sistemica</i></b>	2
- <i>Epidemiologia</i>	2
- <i>Definizione e classificazione</i>	3
- <i>Eziopatogenesi</i>	6
1. Danno endoteliale ed alterazione del microcircolo	7
2. Attivazione dei fibroblasti e danno fibrotico	19
3. Alterazioni del sistema immunitario	25
- <i>Interessamento d'organo</i>	27
1. Cute	27
2. Polmoni	28
3. Tratto gastrointestinale e cuore	29
- <i>Diagnosi</i>	30
<b><i>Modelli animali di SSc</i></b>	33
- <i>Modelli inducibili</i>	33
1. Modello murino di fibrosi cutanea e polmonare indotta da bleomicina	33
2. Modello murino di fibrosi cutanea e polmonare indotta da acido ipocloroso	35
3. Modello murino di fibrosi cutanea e polmonare indotta da topoisomerasi I e adiuvante completo di Freund	36
4. Modello murino di malattia da rigetto del trapianto	37
- <i>Modelli genetici</i>	39
1. Modelli murini Tight skin-1 e Tight skin-2	39
2. Topi transgenici Fra-2	41
3. Topi T $\beta$ RI <sup>CA</sup> ;Cre-ER	41
4. Topi T $\beta$ RII $\Delta$ k	43
- <i>Polli UCD-200/206</i>	44
- <i>Altri modelli murini di SSc</i>	45
<b><i>Il sistema fibrinolitico e uPAR</i></b>	46
- <i>Il recettore dell'urochinasi (uPAR)</i>	51
• Struttura di uPAR	51
• Ligandi di uPAR	53
• Co-recettori di uPAR	58

- Il sistema uPA/uPAR nella proteolisi extracellulare, nell'angiogenesi e nella fibrosi	62
<b><u>SCOPO DEL LAVORO</u></b>	67
<b><u>MATERIALI E METODI</u></b>	70
- Campioni umani di cute	71
- Allestimento e mantenimento della colonia di topi da laboratorio	71
- Metodica di genotipizzazione mediante PCR	73
- Analisi istologica dei campioni murini di cute e di polmone	74
- Valutazione dello spessore dermico sui campioni murini di cute	75
- Determinazione del contenuto di collagene nei campioni murini di cute e di polmone	75
1. Colorazione con rosso sirio picrato	75
2. Dosaggio dell'idrossiprolina	76
- Analisi immunohistochimica sui campioni cutanei di uomo e di topo	76
- Quantificazione dell'immunopositività per la forma nativa di uPAR (D1+D2+D3) nella cute umana	77
- Quantificazione del numero di miofibroblasti e di microvasi nella cute di topo	77
- Immunofluorescenza per la rilevazione di citochine profibrotiche nella cute di topo	78
- Rilevamento dell'apoptosi endoteliale nella cute di topo	79
- Analisi statistica	80
<b><u>RISULTATI</u></b>	81
- I pazienti SSc mostrano una ridotta espressione cutanea della forma nativa di uPAR (D1+D2+D3)	82
- Genotipizzazione del DNA murino	84
- La cute dei topi uPAR <sup>-/-</sup> è caratterizzata da ispessimento dermico, maggiore deposizione di collagene, incremento nel numero dei miofibroblasti e maggiore espressione di citochine profibrotiche	85
- Il derma dei topi uPAR <sup>-/-</sup> mostra una riduzione dei microvasi ed un aumentato numero di cellule endoteliali in apoptosi	91
- I topi uPAR <sup>-/-</sup> sviluppano una fibrosi polmonare progressiva	92
<b><u>DISCUSSIONE</u></b>	95
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	102

# ***INTRODUZIONE***

# La Sclerosi Sistemica

---

La *sclerosi sistemica* (SSc), o sclerodermia, è una malattia multisistemica del tessuto connettivo, ad eziopatogenesi complessa, che è caratterizzata da alterazioni del microcircolo e da fibrosi (Gabrielli et al. 2009; Varga & Abraham 2007; Manetti et al. 2010a; Bhattacharyya et al. 2011). Il termine “sclerodermia”, che deriva dal greco “skleros = duro” e “derma = pelle”, significa letteralmente "pelle indurita", ed infatti il distretto prevalentemente colpito dalla fibrosi è rappresentato dalla cute. Tra gli organi interni e gli apparati interessati dal processo fibrotico si annoverano il cuore, i polmoni, i reni, l'apparato gastrointestinale ed alcuni muscoli scheletrici.

La prognosi della SSc risulta molto grave e la sua incidenza di mortalità, per lo più conseguente a complicanze cardiache, polmonari o renali, notevolmente alta (Tyndall et al. 2010). Nonostante i numerosi progressi compiuti nella ricerca di base e clinica, la patogenesi della SSc non è ancora stata chiarita e non esiste tuttora una terapia in grado di contrastarne l'evoluzione (Ong & Denton 2010). Una diagnosi precoce e la possibilità di prevedere lo sviluppo della SSc rappresentano strumenti fondamentali per l'impostazione di una terapia razionale e per il miglioramento della prognosi, ma, ancor più necessario, sarebbe comprendere le cause che sono alla base dell'insorgenza della malattia.

## **Epidemiologia**

Sebbene sia considerata una patologia rara, la SSc colpisce dai 65 ai 265 individui per milione e la sua incidenza sembra essere sottostimata a causa della mancata diagnosi di molte forme oligosintomatiche o scarsamente evolutive. La malattia è presente in tutti i continenti, colpisce tutte le etnie, con predilezione dei soggetti di colore (Steen &

Medsgger 1990), ed è abbastanza rara nelle prime decadi di vita, mentre nella maggior parte dei pazienti si manifesta tra la quinta e la sesta. Il sesso maggiormente affetto, particolarmente in età fertile, è quello femminile, con un rapporto di 7-12:1 rispetto a quello maschile. L'incidenza della SSc nella popolazione, che è di circa 4-18 nuovi casi l'anno, è costantemente in aumento (Steen & Medsgger 1990). Ciò è probabilmente riconducibile ad una maggior esposizione a particolari fattori tossici ambientali, quali idrocarburi alifatici ed aromatici, amine biogene, anilina, resine epossidiche, silicio, cocaina, alcuni farmaci anoressizzanti ed altri ancora (Cagnoni et al. 1995). Allo stesso tempo è presumibile che un miglioramento della diagnosi, permettendo un accertamento della malattia già nelle fasi precoci, abbia determinato un incremento del numero totale dei casi.

Più del 95% dei pazienti presenta il fenomeno di Raynaud, un vasospasmo episodico e reversibile che colpisce le dita di mani e piedi, più raramente il naso e le orecchie, e che è caratterizzato da un improvviso pallore iniziale seguito da cianosi e, in seguito al ripristino della circolazione sanguigna, da un eritema talvolta doloroso delle parti colpite.

### **Definizione e classificazione**

La sclerodermia fa parte di un gruppo di patologie accomunate da lesioni microvascolari e da un'attivazione fibroblastica permanente che porta ad accumulo di collagene e a conseguente fibrosi. L'ispessimento e l'indurimento della cute sono caratteristiche cliniche cardinali della malattia. Si possono distinguere forme di sclerodermia localizzata, sistemica (meglio definita sclerosi sistemica, SSc), associata ad altre connettiviti (sindromi overlap) e quadri sclerodermici indotti da sostanze tossiche. Alcuni pazienti, pur avendo le caratteristiche sierologiche e vascolari della SSc, non presentano alterazioni cutanee; in questi rari casi la patologia viene indicata come

“sclerosi sistemica sine scleroderma”. Viceversa, esistono diverse patologie fibrosanti che nonostante siano clinicamente caratterizzate da un ispessimento cutaneo, sono correlabili alla SSc solo ad un esame clinico superficiale (Akesson et al. 2003).

La sclerodermia localizzata comprende una forma “lineare” (con una sua variante “en coup de sabre”) e la “morfea” (limitata e generalizzata), in cui è raro l’interessamento sistemico ma che può essere associata a quadri sierologici autoimmunitari o a reperti istologici cutanei di tipo infiammatorio (Falanga 1989).

Il principale criterio per la diagnosi della sclerodermia sistemica e per la sua distinzione da altre connettiviti si basa sulla valutazione della localizzazione, del grado e dell’estensione del coinvolgimento cutaneo, a cui sono correlate indicazioni cliniche, laboratoristiche e di storia naturale della malattia (Subcommittee for Scleroderma Criteria 1980). Questo è anche il primo criterio clinico per la classificazione della SSc nei suoi due subset principali: SSc con coinvolgimento cutaneo limitato (lcSSc) e SSc con coinvolgimento cutaneo diffuso (dcSSc) (LeRoy et al. 1988) (Tavola 1). Circa il 60% dei pazienti affetti da SSc rientra nel subset cutaneo limitato, dove il coinvolgimento viscerale è un evento tardivo e tende a verificarsi dai 10 ai 30 anni dopo l’esordio del fenomeno di Raynaud. La dcSSc, la forma più grave, ha invece un’insorgenza ed un’evoluzione più rapida a causa di importanti danni d’organo, che insorgono spesso entro 5 anni dai primi sintomi.

**Tavola 1.** Subset della sclerosi sistemica (SSc).

---

**SSc cutanea limitata (lcSSc)**

- Fenomeno di Raynaud per anni (occasionalmente decenni).
- Coinvolgimento cutaneo limitato a mani, avambraccia (acrale), faccia e piedi.

- Significativa e tardiva incidenza di ipertensione polmonare, con o senza malattia interstiziale polmonare, nevralgia del trigemino, calcificazioni cutanee, teleangectasie.
- Alta incidenza di anticorpi anti-centromero (ACA) (70-80% dei pazienti).
- Anse capillari dilatate, spesso senza scomparsa dei capillari.

### **SSc cutanea diffusa (dcSSc)**

- Esordio delle alterazioni cutanee (edema o sclerosi cutanea) entro 1 anno dal fenomeno di Raynaud.
- Coinvolgimento cutaneo acrale e del tronco.
- Precoce e significativa incidenza di malattia interstiziale polmonare, insufficienza renale oligurica, malattia gastrointestinale diffusa, coinvolgimento miocardico.
- Assenza di ACA.
- Megacapillari e perdita di capillari in aree del letto periungueale (aspetto "desert like").
- Anticorpi anti-DNA topoisomerasi I (anti-Scl70) (30% dei pazienti).

---

Ogni subset di malattia può evolvere, a sua volta, da una fase precoce, o edematosa, ad una tardiva, o atrofica (Steen & Medsger 1990). La fase precoce si manifesta in tempi e modalità differenti a seconda che si tratti della lcSSc o della dcSSc, ma presenta caratteristiche anatomo-patologiche comuni ai due subset, quali edema ed infiltrato infiammatorio perivascolare. L'edema interessa le dita di mani e piedi, dando origine ai cosiddetti "puffy digits", e può estendersi alle parti prossimali degli arti e al volto. La fase tardiva è invece caratterizzata da una prominente fibrosi (Steen & Medsger 1990), in seguito alla quale la cute si ispessisce, con assottigliamento dell'epidermide e



incremento di spessore del derma, aumenta di consistenza ed appare tesa e lucida. Negli stadi più avanzati le dita assumono l'aspetto di artigli affusolati, con conseguente limitazione dei movimenti articolari, mentre il volto tende a diventare una sorta di maschera contratta.

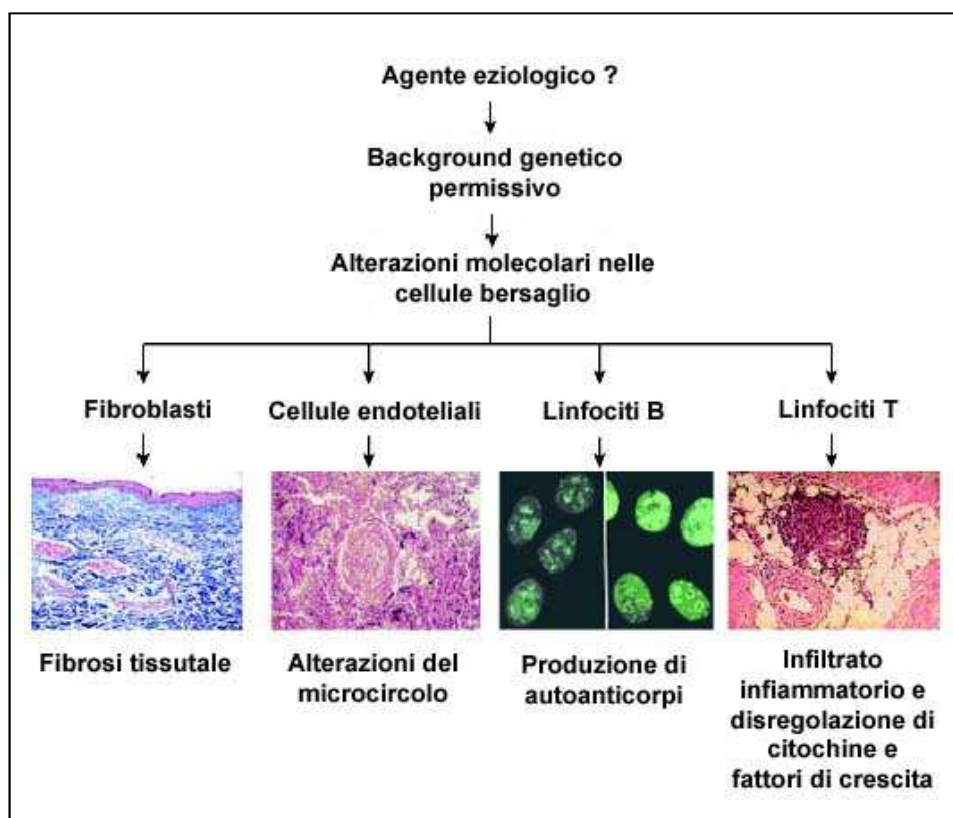
### **Eziopatogenesi**

Sebbene negli ultimi decenni siano stati fatti notevoli progressi nella comprensione e nella caratterizzazione dei processi patologici che avvengono in corso di malattia, non si è ancora riusciti ad identificare un reale agente eziologico. Le ipotesi che, di volta in volta, hanno chiamato in causa l'esposizione ad agenti fisici, chimici o virali, sono infatti rimaste prive di una comprovata dimostrazione scientifica.

Nella patogenesi della SSc gli eventi fondamentali sono rappresentati da (Fig. 1):

- a) danno endoteliale ed estesa alterazione del microcircolo periferico, che determinano una ridotta perfusione tissutale ed una conseguente ischemia cronica (LeRoy 1996);
- b) attivazione dei fibroblasti, che manifestano un'esagerata capacità di sintesi e deposizione di collagene, determinando una fibrosi incontrollata;
- c) anomala attivazione del sistema immunitario, a carico sia dell'immunità umorale che di quella cellulare (Jimenez & Derk 2004; LeRoy 1992; White 1994).

Nonostante sia ormai appurato che le lesioni vascolari precedono la fibrosi e che, con ogni probabilità, svolgono un ruolo di primo piano nello sviluppo della reazione fibrotica stessa, non è invece ancora del tutto chiaro se le anomalie del sistema immunitario precedano (come la maggior parte degli studiosi ritiene) o seguano quelle del circolo periferico. Le alterazioni a carico dell'endotelio e l'infiltrazione tissutale di linfociti T sono caratteristiche tipiche delle fasi iniziali di malattia, mentre la fibrosi rappresenta la lesione finale che provoca danni ad organi ed apparati.



**Figura 1.** Rappresentazione schematica degli eventi fondamentali nella patogenesi della SSc.

### ***1. Danno endoteliale ed alterazione del microcircolo***

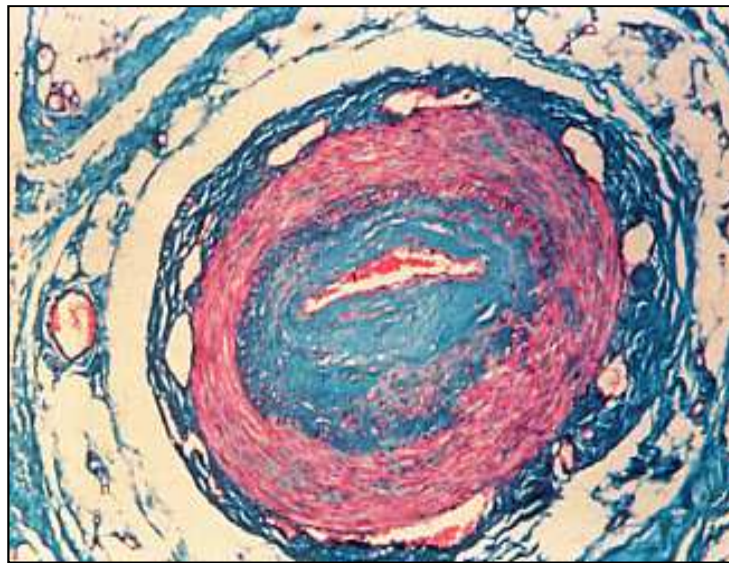
Il meccanismo con cui si realizza il danno vascolare, che compare prima che la fibrosi sia clinicamente rilevabile, è ancora sconosciuto, ma è stata dimostrata, in corso di malattia, la presenza di cellule endoteliali attivate, fenomeno che è considerato un evento primario nella patogenesi della SSc.

Le manifestazioni cliniche del coinvolgimento vascolare sono diverse ed includono uno spettro di cambiamenti prevalentemente a carico del microcircolo e delle arteriole. I cambiamenti patologici vascolari consistono nell'attivazione delle cellule endoteliali, fino all'apoptosi delle stesse, nell'aumentata espressione di molecole di adesione, nella proliferazione dell'intima delle arteriole e, nelle forme più avanzate, nell'occlusione dei vasi e nella necrosi. La maggior parte dei pazienti con SSc presenta una ridotta pressione di perfusione alle mani, condizione che può progredire fino all'occlusione

completa delle arterie digitali, causando necrosi, ulcerazioni ai segmenti distali delle mani ed autoamputazione degli stessi (Kahaleh 2004) (Fig. 2, 3).



**Figura 2.** Ulcerazioni digitali nel secondo e nel terzo dito di un paziente affetto da lcSSc.



**Figura 3.** Arteria digitale di un paziente affetto da SSc (Tricromica di Masson). E' evidente la proliferazione dell'intima e una marcata fibrosi degli strati subintimale ed avventiziale, con la risultante occlusione del lume vasale.

Il danno vascolare nella SSc è diffuso e si manifesta con una triade:

- 1) instabilità vasomotoria generalizzata e tendenza al vasospasmo che, da un punto di vista clinico, sono rappresentate dal fenomeno di Raynaud. Questo, caratterizzato da ripetute interruzioni transitorie della perfusione tissutale, rappresenta spesso un evento

precoce nello sviluppo della malattia. Nei pazienti SSc si assiste ad un aumento dei livelli di endotelina-1 (ET-1), un potente vasocostrittore, e dei suoi recettori. I livelli circolanti di ossido nitrico (NO), invece, che ha azione vasodilatatoria, appaiono ridotti e non aumentano neppure in risposta alla vasocostrizione da raffreddamento (Kahaleh 1991; Kahaleh et al. 1993). Il trombossano A2 (TXA2), infine, potente agente vasocostrittore, risulta aumentato, subendo un ulteriore incremento dopo applicazione di uno stimolo freddo (Reilly et al. 1986).

- 2) anormalità microvascolari ed alterazioni strutturali, che conducono ad ischemia cronica e che sono caratterizzate da proliferazione dell'intima arteriolare, fibrosi degli strati subintimale ed avventiziale, e obliterazione dei vasi.
- 3) manifestazioni patologiche intravascolari, quali ridotta deformabilità eritrocitaria, aumentata attività piastrinica e formazione di trombi, alla base della quale vi sarebbe anche un'attivazione dei granulociti neutrofili, che possono ostruire il lume vasale e rilasciare radicali liberi dell'ossigeno, contribuendo in questo modo al danno endoteliale (Lau et al. 1992).

Quanto detto rende verosimile l'ipotesi che nei pazienti sclerodermici ci sia uno squilibrio tra fattori vasocostrittori e vasodilatatori, primi fra tutti quelli di origine endoteliale, che può determinare una tendenza al vasospasmo e dare luogo al fenomeno di Raynaud. Tutti i pazienti con SSc hanno avuto o avranno sicuramente il fenomeno di Raynaud, mentre solo una piccola percentuale di coloro che lo hanno avuto svilupperanno la SSc (Kahaleh 2004).

La cellula endoteliale svolge un ruolo fondamentale nella struttura e nella funzione dei vasi sanguigni. E' deputata a separare il contenuto vasale dallo spazio interstiziale, prevenire l'aggregazione piastrinica, inibire la cascata della coagulazione e modulare lo stato contrattile delle cellule muscolari lisce della parete vasale (regolazione del tono

vasale). La sua attività secretoria, in particolare, è fondamentale nel modulare il tono vasale. L'endotelio, infatti, produce e secerne varie sostanze. Alcune di esse sono attive sulla muscolatura liscia e ne sono un esempio il NO, che ha azione vasodilatatoria, e la ET-1, che invece ha azione vasocostrittrice; altre sono invece attive sulla funzionalità piastrinica, come la prostaciclina, che impedisce l'aggregazione delle piastrine e la loro interazione con il connettivo sottostante, e il TXA2, che ha invece azioni opposte. Il danno a carico della cellula endoteliale nella SSc sembra essere preceduto da una fase di attivazione (Kahaleh et al. 1992).

Altre alterazioni consistono in modificazioni sieriche o plasmatiche di vari elementi indirettamente coinvolti nell'attivazione/danno endoteliale. Tra di essi i più sensibili indicatori di malattia (per quanto riguarda il compartimento vascolare) sembrano essere il fattore VIII di Von Willebrand, che appare elevato (Kahaleh et al. 1981), e l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), che risulta invece ridotto. Sono inoltre da ricordare la presenza di piastrine attivate, gli autoanticorpi anti-endotelio (AECA), l'aumento dei livelli circolanti della trombomodulina e dell'ET-1. Quest'ultima, in particolare, oltre che un importante marcatore plasmatico di danno endoteliale, rappresenta anche un fattore mitogeno per i fibroblasti (Kikuki et al. 1995). Nei pazienti affetti da SSc le cellule endoteliali esprimono VCAM-1, ICAM-1, selectine P ed E, molecole di adesione che sono espressione di attivazione endoteliale e le cui forme solubili nel plasma risultano più elevate, rispetto alla norma, sin dagli stadi iniziali di malattia (Gruschwitz et al. 1995). Un numero sempre maggiore di dati, inoltre, suggerisce che il danno e la perdita del microcircolo periferico nella SSc siano in parte dovuti ad un aumento del processo apoptotico delle cellule endoteliali, processo che sembra essere aumentato anche nei linfociti ed inibito nei fibroblasti. Numerose cellule endoteliali in apoptosi sono state evidenziate in biopsie cutanee prelevate da pazienti in

fase iniziale di malattia (Sgonc et al. 1996). Ciò è stato correlato alla presenza in circolo di AECA (Pignone et al. 1998), i quali sono in grado di determinare l'adesione dei leucociti all'endotelio (Carvalho et al. 1996) e di indurne poi l'apoptosi (Bordron et al. 1998). Anche meccanismi epigenetici, infine, potrebbero modulare la disfunzione delle cellule endoteliali nella SSc. E' stato infatti recentemente dimostrato che la metilazione del DNA e la deacetilazione degli istoni causano una repressione dell'espressione del recettore di tipo 2 delle proteine morfogenetiche ossee nelle cellule endoteliali microvascolari (MVEC) dermiche di pazienti SSc, e che questa modificazione porta ad un'aumentata suscettibilità delle cellule endoteliali all'apoptosi (Wang & Kahalel 2013). Per quanto riguarda le *piastrine*, la cui attivazione è probabilmente secondaria alle alterazioni dell'endotelio, rispetto ai soggetti normali esse si presentano maggiormente aggregate e dotate di un più elevato contenuto di granuli. Questi contengono  $\beta$ -tromboglobulina (Kahaleh et al. 1982), peptidi dell'attivazione del tessuto connettivo (CTAP), fattore piastrinico 4, trombospondina, fattori di attivazione fibroblastica, fattore di crescita trasformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), ciascuno capace di modificare lo stato delle cellule endoteliali, dei fibroblasti e delle cellule immunitarie. L'aumentata permeabilità vascolare che caratterizza la fase edematosa della SSc permetterebbe alle piastrine di passare nell'interstizio, dove, mediante la liberazione dei loro mediatori, promuoverebbero l'attivazione dei fibroblasti e la conseguente produzione di matrice extracellulare (ECM).

Anche i *radicali liberi dell'ossigeno (ROS)* sembrano avere un ruolo prominente nel processo di danno endoteliale. Il fenomeno di Raynaud, provocando episodi giornalieri di danno da ipossia-riperfusion, danneggia infatti l'endotelio mediante la produzione di ROS e di prodotti reattivi dell'azoto, portando a stress ossidativo e all'inattivazione degli enzimi antiossidanti. Le ipotesi sul meccanismo di danno endoteliale da parte dei ROS

sono due: la prima, secondo la quale le cellule endoteliali sarebbero costitutivamente incapaci di adattarsi alle modificazioni indotte dal processo di riperfusione; l'altra, più verosimile, secondo cui il ciclo continuo di ischemia-riperfusione condurrebbe ad un esaurimento delle capacità proprie della cellula endoteliale di neutralizzare la formazione dei ROS (Matucci et al. 1998). L'ischemia derivante dal fenomeno di Raynaud sollecita le cellule endoteliali ad intraprendere una serie di processi di adattamento per superare l'evento stressante, con aumento della sintesi di proteine e di enzimi "scavenger" (superossido dismutasi, perossidasi del glutatione). Il ripetuto e continuo insulto ischemico, però, alla fine determina l'esaurimento delle capacità adattative delle cellule endoteliali, facilitando lo sviluppo del danno endoteliale e scatenando la cascata di eventi che conducono dal fenomeno di Raynaud alle alterazioni del microcircolo (Kikuki et al. 1995).

Modificazioni strutturali del microcircolo dermico si possono osservare sia alla microscopia ottica che elettronica e coinvolgono principalmente le arteriole e i capillari. Tra gli aspetti più rilevanti di tali modificazioni si ricordano la riduzione del numero dei capillari, l'edema e l'iperplasia delle cellule endoteliali, con ispessimento della membrana basale. Nei vasi di maggior calibro si osserva inoltre iperplasia dell'intima, delaminazione ed ispessimento dell'avventizia (Kahaleh 2004).

La progressiva riduzione del letto microvascolare ed il diminuito flusso sanguigno ai tessuti non sono accompagnati da una sufficiente risposta angiogenetica e conducono, nelle fasi più avanzate, alla comparsa di aree del tutto prive di vasi e ad ischemia cronica.

L'angiogenesi è quel processo biologico che porta alla formazione di nuovi vasi a partire da vasi preesistenti, sia durante la vita embrionale che in quella postnatale. La creazione di nuovi vasi non avviene solo mediante neoangiogenesi, ma coinvolge anche

il processo di vasculogenesi, che consiste nella formazione di nuovi vasi attraverso il reclutamento di cellule endoteliali progenitrici (EPC) dal midollo osseo, fenomeno che prima si pensava avvenisse solo a livello embrionale (Asahara et al. 1999; Bhattacharya et al. 2000).

Il processo angiogenetico è controllato da mediatori stimolanti ed inibenti che, in condizioni fisiologiche, costituiscono un sistema finemente bilanciato, in modo da assicurare che la formazione di nuove strutture vascolari avvenga solo quando è necessaria.

L'angiogenesi si articola secondo una specifica cascata di eventi, che si possono riassumere in quattro fasi e che sono regolati da un preciso programma di induzione genica a carico della cellula endoteliale (Carmeliet 2000):

- ***fase di inizio***, caratterizzata da un aumento della vasodilatazione, da una riduzione del tono e da un aumento della permeabilità vascolare, che è modulata dal NO e dal fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e a cui fa seguito una fuoriuscita di proteine plasmatiche ed edema tissutale;
- ***fase di progressione***, durante la quale si assiste ad una destabilizzazione della membrana basale da parte di proteasi (serino proteasi del sistema di attivazione del plasminogeno, metalloproteasi) che permette alle cellule endoteliali di separarsi le une dalle altre, di invadere la ECM e di migrare e farsi strada nelle zone dove è necessario costruire una nuova rete vascolare;
- ***fase di differenziazione***, caratterizzata dall'assemblamento delle cellule endoteliali attivate in strutture capillari primitive. Questa fase è regolata da fattori angiogenetici che controllano la proliferazione delle cellule endoteliali, sia direttamente che indirettamente, attraverso il rilascio di fattori di crescita da parte di altre cellule del microambiente;



- *fase di maturazione*, che consiste nella differenziazione, stabilizzazione e organizzazione delle cellule endoteliali in una rete capillare tridimensionale e che è diretta dall'azione concertata del fattore di crescita fibroblastica (FGF), del VEGF, delle angiopoietine e di altre citochine e fattori di crescita. Contemporaneamente si ha sia il rimodellamento e la digestione dell'ECM intorno ai raggruppamenti endoteliali, sia la canalizzazione dei neovasi, con formazione di anastomosi ed inizio della perfusione ematica. Cellule muscolari lisce e periciti stabilizzano la parete dei vasi neoformati (Carmeliet 2000; Risau 1997; Cross & Claesson-Welsh 2001).

Tra gli induttori diretti dell'angiogenesi un ruolo chiave è sicuramente rivestito dal VEGF, un potente mitogeno per le cellule endoteliali micro- e macro-vascolari di origine arteriosa e venosa che esercita i suoi effetti legandosi a specifici recettori tirosino-chinasici, il VEGFR-1 (Flt-1) e il VEGFR-2 (Flk-1), presenti sull'endotelio vascolare di piccoli e grandi vasi. Durante l'angiogenesi, il VEGF promuove l'aumento della permeabilità vasale, con conseguente fuoriuscita di proteine plasmatiche, e sembra che i suoi effetti siano mediati principalmente dal NO secreto dalle cellule endoteliali stesse. L'FGF non ha una specificità d'azione esclusiva per le cellule endoteliali, ma ne stimola la proliferazione, la migrazione e la differenziazione, agendo sinergicamente con il VEGF nella sua azione proangiogenetica.

Tra i fattori inibitori è invece da ricordare l'endostatina, che inibisce l'angiogenesi riducendo la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali (O'Reilly et al. 1997).

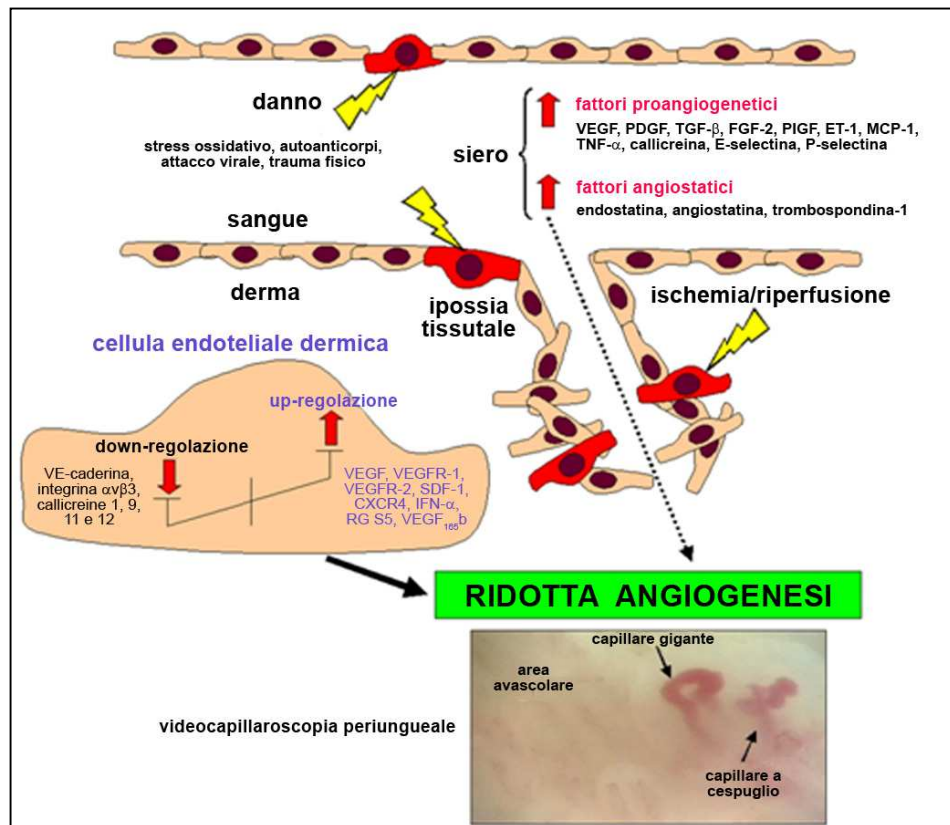
Uno dei fattori fondamentali che concorrono alla severità della SSc è la perdita della capacità angiogenetica. Le alterazioni del microcircolo, infatti, che come già detto in precedenza iniziano fin dalle fasi precoci della malattia, evolvono da uno stadio

caratterizzato da teleangectasie, megacapillari e profonde modificazioni dell'architettura vascolare, indici di un'angiogenesi alterata, ad uno stadio che presenta un aspetto "desert like", caratterizzato da una totale scomparsa dei capillari e quindi da una totale mancanza di eventi angiogenetici. Sebbene l'ipossia che ne consegue costituisca uno dei più potenti stimoli proangiogenetici, nei pazienti affetti da SSc non si assiste ad un'efficace rigenerazione di un microcircolo funzionale. Nonostante i livelli aumentati di numerose molecole proangiogenetiche nella cute e nel siero, la patologia evolve infatti comunque verso la progressiva perdita dei capillari (Distler et al. 2004; Distler et al. 2009).

I dati in letteratura riguardanti le alterazioni del processo angiogenetico in corso di SSc sono talvolta contraddittori. Mentre alcuni autori riportano infatti che il siero di pazienti sclerodermici sia in grado di potenziare le capacità proangiogenetiche delle cellule mononucleate umane normali (Majewski et al. 1985; Polakowski et al. 1988), altri hanno dimostrato che questo ha invece un effetto dannoso sulle MVEC, in quanto è in grado di inibire la loro migrazione e la conseguente formazione di vasi (Mulligan et al. 2007).

In condizioni fisiologiche, durante l'attivazione del processo angiogenetico, le cellule immunitarie sono coinvolte nel meccanismo di attivazione, proliferazione e migrazione delle MVEC mediante la produzione e il rilascio di un ampio spettro di mediatori (Ribatti & Crivellato 2009). Nei pazienti SSc, invece, è stata dimostrata una ridotta attività proangiogenetica dei linfociti e dei monociti circolanti (Kaminski et al. 1984; Koch et al. 1992). Il sovrannatante delle cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico di pazienti SSc è in grado di inibire la chemiotassi delle MVEC e il siero di tali pazienti, inoltre, è in grado di ridurre la capacità angiogenetica delle cellule mononucleate (Kahlel et al. 1986).

Altri studi suggeriscono poi che nella SSc esista uno squilibrio tra fattori proangiogenetici ed antiangiogenetici (Koch & Distler 2007). In uno stadio molto precoce di malattia è presente uno stato infiammatorio che porta ad un aumento della produzione di fattori proangiogenetici e ad una prima breve ed incontrollata risposta angiogenetica. Questa, in poco tempo, subisce però una drastica riduzione e tale fenomeno può essere in parte spiegato dalla presenza e dall'azione di numerosi fattori angiostatici. Nonostante la predominante riduzione dell'angiogenesi, comunque, molti mediatori proangiogenetici rimangono iperespressi nella cute e nel siero dei pazienti SSc (Koch & Distler 2007) (Fig. 4).



**Figura 4.** Meccanismi che determinano la ridotta angiogenesi nella SSc. Uno squilibrio complesso tra fattori proangiogenetici ed antiangiogenetici risulta in un'alterata e ridotta capacità di formare nuovi vasi. Questo porta, come è mostrato dalla videocapillaroscopia periungueale, alla formazione di capillari giganti, capillari ramificati a cespuglio e ad aree di "desertificazione".

Tra i principali fattori proangiogenetici che risultano aumentati nei pazienti SSc troviamo: VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , FGF-2, ET-1, proteina chemoattrattiva-1 per i monociti (MCP-1), fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), le molecole di adesione vascolare E-selectina, P-selectina e le loro forme solubili (Manetti et al. 2010a).

E'interessante notare che molte di queste citochine proangiogenetiche (PDGF, TGF- $\beta$ , FGF-2, ET-1 e MCP-1), essendo anche potenti attivatori delle cellule muscolari lisce dei vasi, dei periciti e dei fibroblasti, potrebbero essere coinvolte nella complessa relazione tra angiogenesi, vasculopatia e fibrosi che esiste nella SSc (Varga & Abraham 2007; Abraham & Distler 2007; Distler et al. 2001). Le cellule muscolari lisce e i fibroblasti, infatti, proliferano e sintetizzano ECM in risposta a fattori rilasciati dalle cellule endoteliali attivate, portando a fibrosi perivascolare, proliferazione dell'intima, deposizione di matrice nella parete dei vasi e obliterazione vasale, con perdita irreversibile dell'integrità vascolare.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'espressione del VEGF è notevolmente aumentata, in correlazione con lo stadio della malattia e con le manifestazioni d'organo, sia nella cute che nel siero dei pazienti SSc (Manetti et al. 2010a). Studi di ibridazione in situ su cute di pazienti sclerodermici hanno evidenziato un'iperpressione dell'mRNA del VEGF rispetto ai controlli sani (Distler et al. 2004). Oltre al VEGF, anche i suoi recettori risultano up-regolati nelle MVEC dermiche della cute dei pazienti SSc (Distler et al. 2004; Mackiewicz et al. 2002). E' stato proposto che la prolungata esposizione al VEGF potrebbe portare alla formazione di una rete caotica di capillari giganti e dalla forma irregolare, come si osserva alla capillaroscopia in pazienti SSc in fase precoce (Guiducci et al. 2007; Sulli et al. 2008). Quindi l'incontrollata e cronica iperpressione del VEGF non porterebbe alla formazione di nuovi capillari maturi, stabili e funzionanti, ma alla generazione di una rete disordinata di capillari non

funzionanti (Distler et al. 2004). E' stato infine recentemente dimostrato come nei pazienti SSc la paradossale mancanza di risposta angiogenetica all'ipossia possa essere dovuta all'iperpressione di una particolare isoforma del VEGF, il VEGF<sub>165b</sub>, che viene generata da uno splicing alternativo nell'esone terminale del pre-mRNA e che ha una potente azione antiangiogenetica (Manetti et al. 2011a).

Un'altra possibile spiegazione della progressiva perdita dei capillari periferici in corso di SSc è che la iperpressione dei fattori proangiogenetici sia in realtà superata da una maggiore iperpressione di fattori angiostatici. Nonostante in letteratura siano presenti risultati contrastanti, infatti, numerosi studi hanno dimostrato che nei pazienti SSc sono presenti elevati livelli di endostatina, angiostatina e trombospondina-1. E' stato inoltre dimostrato, *in vitro*, che MVEC isolate da individui sani, se esposte al plasma di pazienti SSc, mostrano una ridotta migrazione e proliferazione, fenomeno che si verifica quando le stesse cellule vengono stimulate con l'angiostatina (Mulligan et al. 2007). Esistono poi numerose evidenze sul fatto che le piastrine possano giocare un ruolo chiave nel disequilibrio tra fattori proangiogenetici e fattori angiostatici. Le piastrine, infatti, all'interno dei loro granuli  $\alpha$ , contengono sia numerosi fattori proangiogenetici (VEGF, FGF-2, PDGF e TGF- $\beta$ 1) che inibitori dell'angiogenesi (fattore piastrinico 4, endostatina e trombospondina-1) (Italiano et al. 2008). Nei pazienti SSc le piastrine, immagazzinando e trasportando elevati livelli di VEGF, possono rappresentare una fonte di VEGF circolante e, attivandosi in seguito al contatto con l'endotelio danneggiato, contribuire al deficit angiogenetico (Solanika et al. 2009). Le piastrine, inoltre, rilasciano molecole che agiscono sul tono vascolare (NO, serotonina, TXA<sub>2</sub>, prostaglandine) e altre che sono coinvolte nell'infiammazione, nella proliferazione dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce dei vasi e nella sintesi dei componenti della ECM e degli enzimi che la degradano (Postlethwaite & Chiang 2007).

Studi di microarray che hanno comparato i profili di espressione dei fattori proangiogenetici ed antiangiogenetici nelle MVEC isolate dal derma di soggetti sani e in quelle di pazienti SSc hanno evidenziato differenze significative nell'espressione dei geni delle callicreine 9, 11 e 12, molecole proangiogenetiche risultate down-regolate nelle MVEC degli individui malati, e nell'espressione del gene della callicreina 3, una molecola antiangiogenetica che appariva invece up-regolata (Giusti et al. 2005; Giusti et al. 2006).

E' stato poi recentemente dimostrato che nella cute dei pazienti SSc, insieme alla perdita dei capillari, è riscontrabile anche un grave cambiamento del fenotipo dell'endotelio dei microvasi rimanenti (Manetti et al. 2010a). Il fenotipo vascolare sclerodermico è caratterizzato dalla perdita della caderina vascolare endoteliale (VE-caderina), marcatore endoteliale richiesto per la formazione e la stabilizzazione dei vasi, e da una iperespressione di molecole antiangiogenetiche come l'interferone alfa (IFN- $\alpha$ ).

Numerosi studi, infine, suggeriscono che alla base della perdita dei capillari vi sia anche un difetto della vasculogenesi e della riparazione vascolare, ipotesi comprovata dalla presenza di un alterato numero di EPC circolanti e dalle alterazioni del differenziamento delle cellule staminali mesenchimali, derivate dal midollo osseo, in cellule endoteliali (Distler et al. 2009; Cipriani et al. 2007).

## ***2. Attivazione dei fibroblasti e danno fibrotico***

La fibrosi è la caratteristica patologica principale della SSc. Nonostante molti ricercatori ritengano che questa sia il risultato di un alterato e generalizzato processo di riparazione tissutale, un evento scatenante non è ancora stato identificato (Wynn 2008).

Un ruolo cruciale nell'instaurarsi del processo fibrotico in corso di SSc è svolto dai fibroblasti, che risultano costitutivamente attivati e che presentano una proliferazione

incontrollata (Hinz et al. 2012). Questi sono inoltre caratterizzati da una resistenza agli stimoli proapoptotici e da una maggiore predisposizione alla trasformazione in miofibroblasti. In condizioni fisiologiche i fibroblasti producono quantità limitate di ECM; a seguito di un danno tissutale, invece, il rilascio localizzato di citochine profibrotiche e di fattori di crescita da parte delle cellule infiammatorie e del sistema immunitario, delle piastrine e delle cellule endoteliali, crea un microambiente che determina una loro attivazione persistente, portandoli a transdifferenziare in miofibroblasti, a produrre componenti dell'ECM in modo incontrollato e a secernere, a loro volta, fattori di crescita e citochine profibrotiche che perpetuano il processo in maniera autocrina e paracrina (Fig. 4). I mediatori profibrotici che sembrano essere maggiormente implicati nella patogenesi della SSc sono: TGF- $\beta$ , fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), PDGF, interleuchine (IL-6, IL-13), ET-1 e serotonina (Gabrielli 2009; Varga 2007; Wynn 2008).

Nella SSc, le stesse cellule endoteliali possono contribuire all'attivazione dei fibroblasti: direttamente, tramite il rilascio di fattori chemiotattici e di ET-1, o indirettamente, attivando le cellule del sistema immunitario, che, a loro volta, inducono l'attivazione dei fibroblasti producendo TGF- $\beta$  e altri fattori di crescita.

I fibroblasti isolati da biopsie di cute coinvolta da malattia presentano il cosiddetto "fenotipo sclerodermico", caratterizzato da un incremento dei livelli di mRNA per il pro-collagene e per la fibronectina e da un' aumentata sintesi di glicosaminoglicani.

Le forme di collagene maggiormente prodotte in corso di SSc sono quella di tipo I, III (presente in special modo a livello del derma reticolare nelle lesioni di più recente insorgenza) e VI (perivascolare).

I miofibroblasti, che risultano significativamente aumentati nella cute dei pazienti SSc, esprimono la  $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) e mostrano un fenotipo intermedio

tra quello di un fibroblasta e quello di una cellula muscolare liscia. Mentre durante il normale processo di riparazione tissutale i miofibroblasti sono presenti solo temporaneamente nel tessuto di granulazione, in corso di SSc persistono, portando ad un'eccessiva contrazione della ECM e ad un processo di cicatrizzazione cronico. Inizialmente si pensava che i miofibroblasti potessero derivare esclusivamente da fibroblasti residenti nel tessuto connettivo; studi recenti hanno invece dimostrato che tali cellule possono originare anche a partire da periciti, fibrociti, ossia precursori circolanti di fibroblasti derivanti dal midollo osseo, nonché da cellule epiteliali e cellule endoteliali, mediante una transizione epitelio-mesenchimale ed endotelio-mesenchimale (Varga & Abraham 2007; Manetti et al. 2011b; Duffield 2012; Manetti & Bayer 2013). Tuttavia, quale sia l'origine esatta dei miofibroblasti che iniziano e sostengono la reazione fibrotica che caratterizza la SSc rimane ancora da definire.

Oltre ai fibroblasti e ai miofibroblasti, anche altri tipi di cellule stromali sembrano essere implicate nella fisiopatologia della SSc. Ne sono un esempio i telociti, cellule dai lunghi processi citoplasmatici che svolgono una funzione di supporto, formando un'impalcatura che è atta a definire la corretta organizzazione tridimensionale dei tessuti e degli organi durante la vita prenatale e a guidarne il rinnovamento e la riparazione durante quella postnatale. Nella cute dei pazienti affetti da SSc, ed in particolare da dcSSc, i telociti appaiono severamente danneggiati dal punto di vista ultrastrutturale e significativamente ridotti di numero. E' stato quindi ipotizzato che la loro progressiva perdita possa contribuire all'alterata organizzazione tridimensionale della ECM e al ridotto controllo dell'attività dei fibroblasti e dei miofibroblasti (Manetti et al. 2013).

Il principale mediatore del processo fibrotico è rappresentato dal TGF- $\beta$ , che promuove l'instaurarsi della fibrosi sia stimolando la produzione di ECM sia inibendone la degradazione (Varga & Abraham 2007; Wynn 2008). Il TGF- $\beta$ , prodotto e rilasciato da



numerosi tipi cellulari, tra cui fibroblasti, miofibroblasti, linfociti T, monociti, macrofagi e piastrine, viene sintetizzato come un complesso latente ed inattivo che è sequestrato dalle proteine della ECM. La sua trasformazione nella forma biologicamente attiva è mediata da proteasi ed integrine espresse sulla superficie di fibroblasti e di altre cellule. Una volta attivo, il TGF- $\beta$  si lega al suo recettore di membrana, il TGF $\beta$ RII, e dà inizio ad una cascata di trasduzione del segnale che, attraverso il reclutamento e la fosforilazione del TGF $\beta$ RI, coinvolge la famiglia delle proteine Smad e, in ultima analisi, determina un aumento dell'espressione di numerosi geni target, quali quelli del collagene di tipo I, del CTGF, dell' $\alpha$ -SMA e dell'inibitore di tipo I dell'attivatore del plasminogeno (Varga & Abraham 2007; Wynn 2008). Fibroblasti isolati da pazienti affetti da SSc presentano elevati livelli di espressione dei recettori del TGF- $\beta$ , in particolare del TGF $\beta$ RI, e questo potrebbe spiegare, almeno in parte, la maggiore suscettibilità di tali cellule alla stimolazione con il TGF- $\beta$ . Smad2 e Smad3, che in seguito all'attivazione del TGF $\beta$ RI e alla loro conseguente fosforilazione formano un complesso eterodimerico che va a legarsi al promotore dei geni bersaglio, sono i regolatori cruciali del signaling del TGF- $\beta$ . I fibroblasti dei pazienti SSc mostrano numerose anomalie della via di segnalazione del TGF- $\beta$ , infatti sono caratterizzati da un'aumentata espressione e fosforilazione di Smad2 e Smad3 e da una ridotta espressione e funzionalità del loro inibitore endogeno, Smad7 (Manetti & Beyer 2013).

Il TGF- $\beta$ , oltre a regolare la sintesi delle proteine della ECM, inibisce anche la produzione di metalloproteasi (MMP) e collagenasi e stimola la produzione di inibitori delle proteasi, come l'inibitore tissutale delle MMP (TIMP-1). Il TGF- $\beta$ , infine, stimola potentemente la sintesi di CTGF da parte dei fibroblasti, delle cellule muscolari lisce dei

vasi e delle cellule endoteliali. A sua volta, il CTGF sembra essere coinvolto in un loop autocrino di stimolazione della propria sintesi, permettendo il perpetuarsi di un ciclo vizioso profibrotico (Leask et al. 2002). Aumentati livelli di CTGF sono stati riscontrati nei tessuti affetti di pazienti SSc.

Anche l'ET-1 risulta iperespressa nei fibroblasti SSc ed il blocco farmacologico dei suoi recettori *in vitro* riduce significativamente la sintesi di ECM, l'espressione dell' $\alpha$ -SMA e le proprietà contrattili di tali cellule (Varga & Abraham 2007; Manetti & Beyer 2013).

Il PDGF, che è prodotto sotto stimolazione da fibroblasti, cellule endoteliali, macrofagi e piastrine, è un potente fattore mitogenico e chemotattico per i fibroblasti ed è in grado di stimolare la sintesi dei componenti dell'ECM e la secrezione degli altri mediatori profibrotici da parte dei fibroblasti stessi. Un'aumentata espressione e fosforilazione dei recettori del PDGF è stata evidenziata nella cute e nei fibroblasti di pazienti SSc e, recentemente, nel loro siero, sono stati identificati anche autoanticorpi agonisti di tali recettori.

Le piastrine rappresentano un'importante fonte di mediatori profibrotici, infatti i loro granuli, oltre al TGF- $\beta$  e al PDGF, contengono anche grandi quantità di serotonina. In condizioni fisiologiche, il danno vascolare, attivando la degranolazione piastrinica, induce il rilascio dei mediatori profibrotici, che assicurano in questo modo una efficiente e controllata riparazione del danno. In corso di SSc, al contrario, la vasculopatia cronica induce un persistente rilascio di serotonina, provocando in questo modo un ininterrotto processo di riparazione tissutale ed una conseguente fibrosi. La serotonina stimola infatti i fibroblasti a produrre eccessive quantità di ECM (Fig. 5). Gli effetti profibrotici della serotonina sono mediati esclusivamente dal suo legame con i recettori 5HT<sub>2B</sub>, che determina un rilascio di TGF- $\beta$  ed una conseguente produzione di collagene. Questi recettori sono iperespressi nella SSc e ciò rende i fibroblasti

maggiormente sensibili all'azione della serotonina. La persistente attivazione piastrinica ed il conseguente rilascio della serotonina, quindi, promuovono lo sviluppo della fibrosi e rappresentano un importante collegamento tra il danno vascolare ed il processo fibrotico in corso di SSc (Manetti & Beyer 2013; Dees et al. 2011).

Anche l'IL-6, che è prodotta da macrofagi, linfociti B ed altri tipi cellulari, è in grado di stimolare la produzione di collagene da parte dei fibroblasti e per questo sembra avere un possibile ruolo nella patogenesi della SSc. Nel modello animale di fibrosi indotta da bleomicina, il *knockout* del gene dell'IL-6 o l'utilizzo di anticorpi diretti contro tale molecola è in grado di inibire la risposta profibrotica (Kitaba et al. 2012).

Oltre ad un'aumentata attività dei mediatori profibrotici, è stato poi dimostrato che anche una ridotta espressione degli inibitori dell'attivazione fibroblastica può svolgere un ruolo importante nell'instaurarsi del processo fibrotico. Ne sono un esempio il fattore di trascrizione Fli-1 (Asano et al. 2010) e alcuni tipi di microRNA (Vettori et al. 2012).

Altri fattori implicati nel meccanismo di eccessiva sintesi ed accumulo di ECM sembrano poi essere l'ipossia e la conseguente formazione di ROS, che sono in grado di stimolare i fibroblasti attivando il signaling del TGF- $\beta$  e del PDGF (Baroni et al. 2006) (Fig. 5). Numerosi studi hanno infatti messo in evidenza, nei pazienti sclerodermici, la presenza di ridotti livelli sierici di antiossidanti e di un aumentato numero di marcatori di danno ossidativo. Con la progressione della fibrosi, la distanza tra i vasi sanguigni e le cellule interstiziali aumenta, portando ad un'ulteriore riduzione dell'apporto di ossigeno per i fibroblasti e creando, in questo modo, un vero e proprio circolo vizioso di ipossia e attivazione profibrotica dei fibroblasti stessi (Beyer et al. 2009).

La persistente attivazione dei fibroblasti nella SSc potrebbe inoltre essere dovuta anche ad una loro resistenza a stimoli proapoptotici. E' stata infatti dimostrata la presenza di uno sbilanciamento nel rapporto tra la proteina pro-apoptotica Bax (Santiago et al.

2001) e quella anti-apoptotica Bcl2, che è quindi in grado di selezionare una popolazione di fibroblasti resistenti all'apoptosi e particolarmente responsivi al TGF- $\beta$  (Jelaska & Korn 2000).

### ***3. Alterazioni del sistema immunitario***

Le alterazioni immunologiche in corso di SSc sono a carico di entrambe le componenti del sistema immunitario, quella umorale e quella cellulare.

#### *Immunità umorale*

Oltre agli AECA, responsabili del danno diretto all'endotelio, in corso di SSc si possono trovare anche altri tipi di autoanticorpi. Il 95% dei pazienti presenta anticorpi anti-nucleari (ANA) in grado di reagire con svariati bersagli intranucleari (Okano 1996). In particolare, due tipi di ANA sono specifici della SSc. Il primo, diretto contro la DNA-topoisomerasi I (anti-Scl70), è caratteristico della dcSSc e risulta positivo nel 30-40% dei pazienti. I soggetti che presentano questo anticorpo hanno una maggiore probabilità di sviluppare fibrosi polmonare e vasculopatia periferica, nonché un più rapido coinvolgimento cutaneo e renale. Il secondo, diretto contro proteine del centromero (ACA), si ritrova nel 70-80% dei pazienti con lcSSc ma è meno specifico, in quanto presente anche in pazienti con cirrosi biliare diffusa. Raramente lo stesso paziente presenta entrambi gli anticorpi.

#### *Immunità cellulare*

Il ruolo svolto dall'immunità cellulare nella patogenesi della SSc è evidenziato dalla presenza di infiltrati cellulari mononucleari nei tessuti affetti, da un'alterata funzione delle cellule T-helper e dei monociti, da una ridotta attività delle cellule natural killer e dal rilascio di vari tipi di citochine (Fig. 5).

E' stato osservato che *linfociti* T CD4+ si accumulano nella cute, liberando citochine capaci di reclutare altre cellule infiammatorie come macrofagi e mastociti. Questi rilasciano mediatori quali l'istamina, citochine, interleuchine, in particolare IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, e fattori di crescita (TNF- $\alpha$ , PDGF, FGF, TGF- $\beta$ ), che possono attivare i fibroblasti per la sintesi di collagene e di altre proteine della ECM (Rothfield 1992). Mentre nella cute predomina la sottopopolazione T-helper CD4+, nel liquido di lavaggio broncoalveolare sono maggiormente presenti le cellule T-citotossiche CD8+ (White 1996). Il fenotipo linfocitario T-helper è quello che sembra predominare sin dalle fasi precoci di malattia (Roumm et al. 1984). A livello dei linfociti T CD4+ è stata anche dimostrata un'inibizione dell'apoptosi (Stummvoll et al. 2000).

Anche i *macrofagi*, data la loro capacità di produrre mediatori come TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, proteasi e altri mediatori solubili che possono essere importanti nella patogenesi della SSc, sembrano poter aver un ruolo nella genesi della malattia.

I *mastociti*, a livello delle lesioni tissutali, si localizzano vicino ai vasi, dove contribuiscono al loro danneggiamento mediante il rilascio di triptasi, una potente endopeptidasi che è capace di ledere le cellule endoteliali e di attivare la produzione di TGF- $\beta$  e di istamina. Quest'ultima stimola poi la sintesi dell'ECM. Nelle lesioni cutanee sclerodermiche è presente un elevato numero di mastociti in fase di degranulazione, e il siero di pazienti SSc contiene elevate quantità delle proteine derivate dalla loro degranulazione.

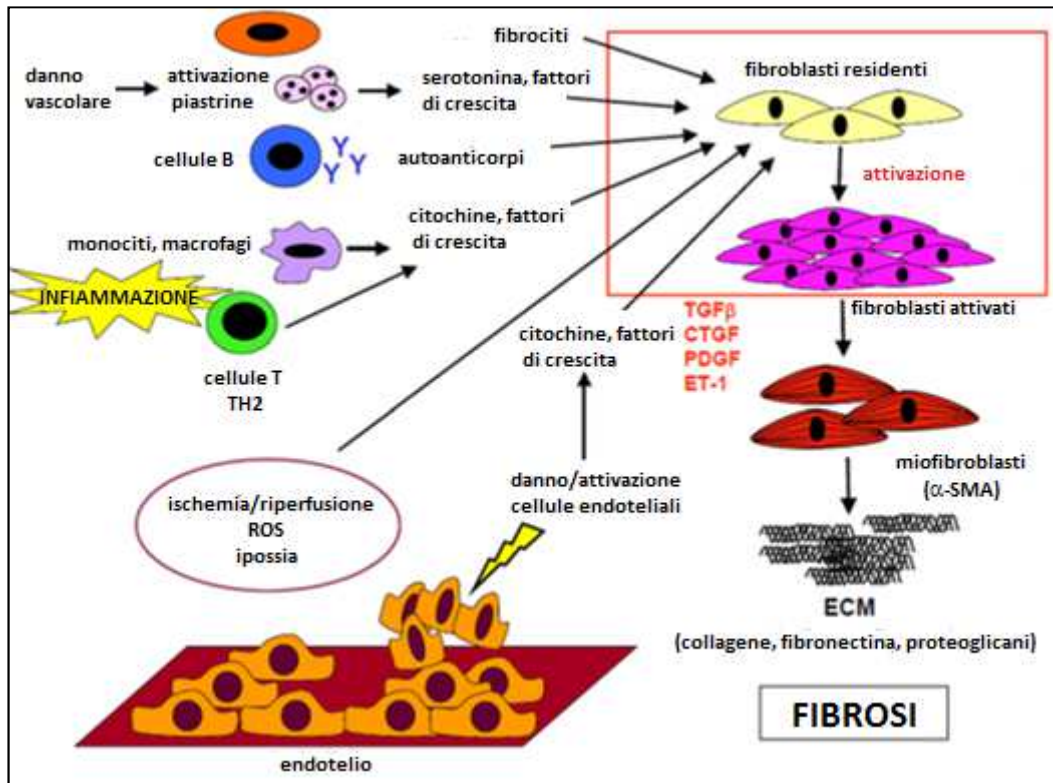


Figura 5. Cross-talk tra vari tipi cellulari coinvolti nella patogenesi della SSc.

## Interessamento d'organo

### 1. Cute

Le modificazioni patologiche a livello cutaneo sono quelle che contraddistinguono maggiormente la SSc. Con il progredire della malattia si assiste al progressivo ispessimento del derma e all'assottigliamento dell'epidermide, eventi che portano ad indurimento e perdita di elasticità della cute. In entrambi i subset, limitato e diffuso, la fase precoce è caratterizzata da edema a livello delle mani, in particolare delle dita, e da infiltrato infiammatorio nello spazio perivascolare. Dopo un periodo di tempo variabile, che può andare da poche settimane a diversi mesi, l'edema viene sostituito da indurimento e ispessimento della cute, che perde quindi elasticità e non è più sollevabile in pliche (fase "sclerotica"). Con l'avanzamento della malattia la cute si assottiglia (fase "atrofica"), con appiattimento delle papille dermiche, accumulo di fasci di collagene e

perdita di alcuni annessi cutanei, come i bulbi piliferi e le ghiandole sebacee (Hashimoto et al. 1983). Le ghiandole sudoripare sono gli annessi cutanei maggiormente risparmiati anche nelle fasi più avanzate, sebbene vengano avvolte e pressate dall'enorme accumulo di collagene e la loro funzione risulti apparentemente ridotta (Hashimoto et al. 1983; Casale et al. 2004).

L'ispessimento cutaneo che si manifesta nei pazienti affetti dalla forma limitata spesso coinvolge solo le dita, talvolta anche il volto, oppure l'intera mano e le regioni più distali dell'avambraccio. In questo stadio la malattia può rimanere stabile per anni senza coinvolgimento di regioni cutanee più prossimali. Nella forma diffusa, invece, l'ispessimento cutaneo si diffonde rapidamente in senso centripeto ed entro alcuni mesi può coinvolgere avambraccia, braccia, viso ed infine il torace e l'addome.

## ***2. Polmoni***

L'interessamento polmonare è tra le più frequenti e importanti manifestazioni della SSc ed è presente, anche se con grande variabilità per estensione ed evoluzione, in circa il 70% dei pazienti. I due tipi più comuni di malattia polmonare sono rappresentati essenzialmente dall'ipertensione polmonare e dalla pneumopatia interstiziale aspecifica (NSIP).

L'ipertensione polmonare può essere dovuta alla presenza di fibrosi polmonare o ad ipertensione arteriosa polmonare (PAH). Quest'ultima è causata da un processo patologico a carico dei piccoli vasi polmonari che è caratterizzato da ispessimento delle pareti vascolari e dalla formazione di microtrombi, con conseguente riduzione sia del calibro che dell'elasticità vascolare. L'organismo risponde a questo aumento di pressione nel circolo polmonare con ipertrofia e dilatazione del ventricolo destro, che nel tempo porta a scompenso del cuore destro.

La PAH è una condizione rara ma molto severa, con un alto rischio di mortalità, ed i pazienti SSc hanno un rischio maggiore di andarvi incontro rispetto alla popolazione generale.

La NSIP è una interstiziopatia polmonare infiammatoria il cui pattern anatomicopatologico è caratterizzato dalla presenza di infiltrato infiammatorio cellulare diffuso, prevalentemente rappresentato da linfociti, e da fibrosi interstiziale. Nelle fasi iniziali di malattia si assiste ad un accumulo irregolare di cellule infiammatorie (linfociti, plasmacellule, eosinofili e macrofagi) nelle pareti alveolari, con liberazione di mediatori che danneggiano sia le cellule parenchimali che la matrice connettivale. La successiva risposta riparativa è sotto il controllo dei macrofagi, che intervengono nella liberazione di mediatori in grado di promuovere la fibrogenesi e la produzione di fibronectina. Vengono prodotti anche il fattore di crescita derivante dai macrofagi alveolari (AMDGF) e l'IL-1, che agiscono accelerando la proliferazione dei fibroblasti. Con l'evolvere dell'interstiziopatia si ha quindi un graduale aumento della distanza aria-gas, con difficoltà più o meno marcate della diffusione gassosa, una riduzione del volume d'aria contenuto negli spazi alveolari e una modificazione delle caratteristiche meccaniche del parenchima polmonare. L'interstiziopatia polmonare rappresenta infatti una delle cause maggiori di morte nei pazienti SSc.

### ***3. Tratto gastrointestinale e cuore***

Il coinvolgimento del tratto gastrointestinale è una delle manifestazioni cliniche più precoci e si osserva in più del 90% dei casi, sia in pazienti lcSSc che dcSSc. L'esofago distale è quasi sempre affetto, anche se l'esatta patogenesi della dismotilità esofagea rimane ancora da chiarire. Nelle fasi iniziali di malattia si assiste, a causa di processi vascolari ed autoimmuni, ad una ridotta funzionalità della muscolatura liscia, mentre nelle fasi più avanzate i cambiamenti più evidenti sono di carattere fibrotico. Con



l'evolversi della SSc si può avere l'interessamento dell'intero tratto gastrointestinale, che si presenta caratterizzato da atrofia delle cellule muscolari lisce e da lesioni fibrotiche a livello della lamina propria, della sottomucosa e degli strati muscolari (Manetti et al. 2007). Da un punto di vista clinico la dismotilità del tratto gastrointestinale rappresenta una delle manifestazioni viscerali più rilevanti e può manifestarsi sia in modo asintomatico che sotto forma di una grave paresi.

Anche la fibrosi del miocardio può rimanere clinicamente silente o essere associata a disfunzione diastolica ed aritmie.

## **Diagnosi**

Il quadro clinico che caratterizza la fase conclamata della SSc ne rende relativamente semplice la diagnosi, mentre nelle sue fasi iniziali la malattia risulta molto meno agevole da diagnosticare.

Per l'identificazione dei casi vengono comunemente utilizzati i criteri proposti e pubblicati nel 1980 dall'American College of Rheumatology (Subcommittee for Scleroderma Criteria 1980). Non essendo comunque possibile diagnosticare la malattia con un singolo esame, vista la sua diffusione sistemica, sono necessari molteplici test per valutare i diversi distretti interessati.

Gli esami di laboratorio, ed in particolare la ricerca degli autoanticorpi (soprattutto gli ANA), risultano molto importanti. Gli ACA sono indicativi della lcSSc, mentre gli anti-Scl70 della dcSSc.

La tecnica più ampiamente utilizzata per valutare il grado di ispessimento e/o indurimento cutaneo è lo "score cutaneo modificato da Rodnan" (mRSS), dove 17 aree del corpo vengono esaminate con la palpazione e ad ognuna viene assegnato un punteggio dello spessore cutaneo che va da 0 a 3 (0=spessore normale; 1=leggero ispessimento; 2=moderato ispessimento; 3=severo ispessimento). Il range del mRSS va

quindi da 0 (nessun ispessimento cutaneo) a 51 (punteggio 3 per tutte le 17 aree esaminate) (Black 1995; Seibold 2001; Clements et al. 1995). Le aree esaminate nel mRSS includono le dita, le mani, le avambraccia, le braccia, le cosce, le gambe, i piedi, la faccia, il torace e l'addome.

Il danno microvascolare rappresenta uno dei fattori chiave già nelle prime fasi di malattia. La microangiopatia sclerodermica è caratterizzata da alterazioni strutturali dei capillari e da una progressiva riduzione del loro numero. Sono inoltre riscontrabili capillari ectasici, capillari giganti (megacapillari), microemorragie e capillari ramificati, con sovvertimento dell'architettura vascolare stessa. La microangiopatia, quindi, potendo precedere gli altri sintomi anche di molti anni, sembra essere il miglior fattore predittivo valutabile per lo sviluppo della SSc. La diagnosi clinica del coinvolgimento vascolare include l'accertamento del fenomeno di Raynaud, la presenza di ulcere nelle dita, di teleangectasie, l'esame videocapillaroscopico periungueale (VCP) e il dosaggio di marcatori circolanti che riflettono il danno, l'attivazione e l'iperattività vascolare (Kahaleh et al. 2003).

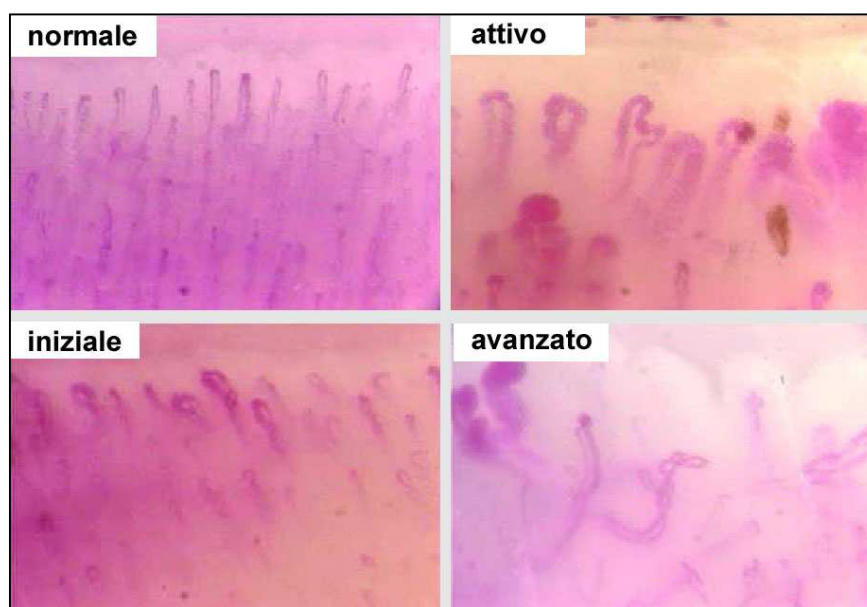
Mediante VCP è stato possibile classificare la microangiopatia sclerodermica in tre differenti pattern capillaroscopici ("iniziale" o "early", "attivo" o "active" ed "avanzato" o "late"), che risultano correlati con la durata del fenomeno di Raynaud e della SSc (Sulli et al. 2004).

Il pattern "iniziale" è caratterizzato da pochi capillari ectasici o giganti, poche microemorragie, architettura capillare relativamente conservata e non evidente perdita di capillari (Fig. 6). Il pattern "attivo" presenta frequenti capillari giganti e microemorragie, moderata perdita di capillari, modesto sovvertimento dell'architettura vascolare e capillari ramificati assenti o sporadici (Fig. 6). Il pattern "avanzato" è invece caratterizzato da irregolare dilatazione capillare, pochi o assenti capillari giganti e

microemorragie e severa perdita di capillari, con estese aree avascolari, sovvertimento della normale architettura microvascolare e frequenti capillari ramificati (Fig. 6).

I pazienti con pattern "iniziale" o "attivo" sono più frequentemente affetti da lcSSc, mentre quelli con pattern "avanzato" presentano più spesso una dcSSc (Sulli et al. 2004).

I distinti pattern VCP riflettono l'evoluzione della microangiopatia periferica e correlano con alcune caratteristiche cliniche, pertanto la loro identificazione risulta utile per la stadiazione della SSc e il monitoraggio della progressione della microangiopatia stessa.



**Figura 6.** Differenti pattern videocapillaroscopici. Il pattern “attivo” è caratterizzato da numerosi capillari giganti, microemorragie, moderata perdita di capillari e lieve sovvertimento dell’architettura vascolare, con assenti o rari capillari ramificati. Nel pattern “iniziale” l’architettura e la densità capillare appaiono conservate, mentre sono presenti capillari ectasici, giganti e microemorragie. Un grave sovvertimento dell’architettura capillare ed aree avascolari caratterizzano invece il pattern “avanzato”.

# Modelli animali di SSc

---

L'utilizzo dei modelli animali in ambito scientifico ha da sempre rivestito un'importanza fondamentale, in quanto grazie ad essi è possibile studiare i meccanismi patogenetici che stanno alla base delle malattie e, allo stesso tempo, testare l'efficacia e la sicurezza di nuove potenziali strategie terapeutiche.

Nonostante negli ultimi anni siano stati messi a punto svariati modelli animali per la SSc, nessuno di essi sembra essere in grado nè di mimare il decorso della malattia umana, nè di riprodurre tutte le caratteristiche patologiche. I principali modelli sviluppati fino ad oggi possono essere suddivisi in due gruppi: modelli inducibili e modelli genetici (Avouac et al. 2013).

## ***MODELLI INDUCIBILI***

### **1. Modello murino di fibrosi cutanea e polmonare indotta da bleomicina**

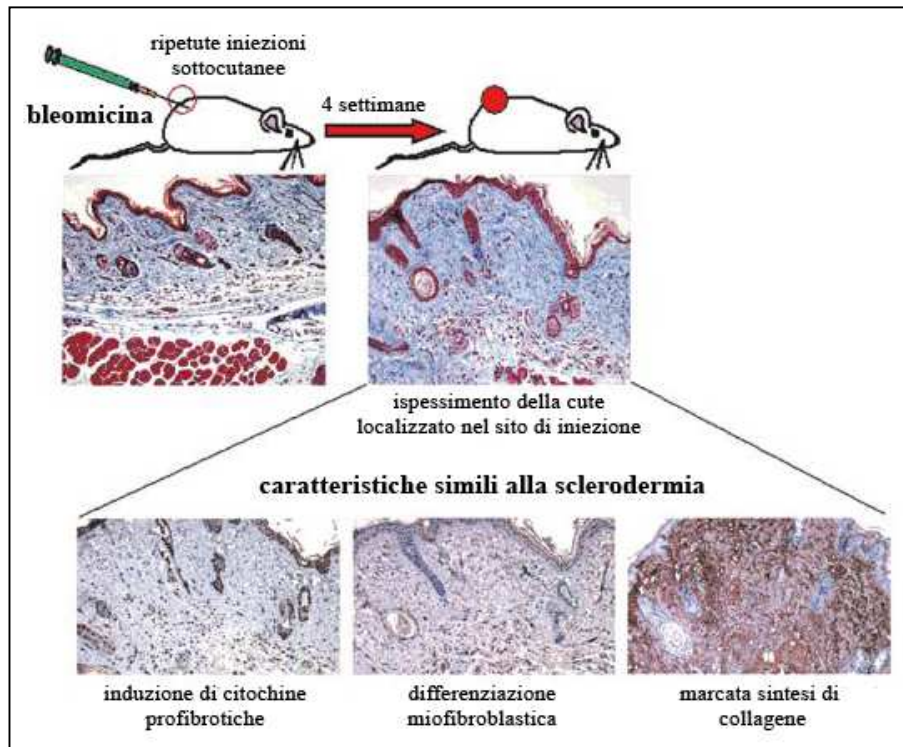
Ideato nel 1999 da Yamamoto et al. ed ampiamente utilizzato, in quanto capace di fornire importanti informazioni sulla patogenesi della SSc umana, questo modello è in grado di indurre fibrosi sia cutanea che polmonare e consiste nell'eseguire, per un periodo di tempo di 4 settimane, iniezioni sottocutanee giornaliere di bleomicina, un potente agente chemioterapico (Yamamoto et al. 1999) (Fig. 7).

Le alterazioni fibrotiche a carico della cute rimangono localizzate nell'area di iniezione, persistono per sei settimane dal termine del trattamento e, da un punto di vista istopatologico, si presentano caratterizzate da fasci ispessiti di collagene e da infiltrato cellulare (Fig. 7).

A livello polmonare, invece, la fibrosi si manifesta con un ispessimento delle pareti alveolari e, nelle fasi iniziali, con la presenza di infiltrato cellulare (Yamamoto 2006)

(Fig. 7). In questo modello, lo sviluppo della fibrosi sembra essere innescato da un eccessivo stress ossidativo, con produzione di ROS e successiva risposta infiammatoria. La somministrazione di bleomicina, inoltre, induce danno endoteliale e porta ad un aumento dell'espressione delle molecole di adesione (Yamamoto & Nishioka 2005). Ciò determina il reclutamento di linfociti T, monociti e mastociti, i quali, a loro volta, inducono attivazione fibroblastica e conseguente sintesi ed accumulo di ECM. La cute trattata con la bleomicina mostra infatti alti livelli dei mediatori profibrotici TGF- $\beta$ , PDGF, MCP-1, IL-3, IL-6 e IL-13, oltre che una maggiore deposizione di collagene I, un incremento del numero dei miofibroblasti ed un'aumentata espressione sia dell'inibitore tissutale delle MMP (TIMP-1) che dell'inibitore degli attivatori del plasminogeno-1 (PAI-1). La presenza di anticorpi anti-DNA topoisomerasi I (anti-Sc170) e anti-istone sembra inoltre far pensare ad un coinvolgimento sistemico (Ishikawa et al. 2008). Il processo infiammatorio precede la comparsa della fibrosi, mostrando in questo modo delle notevoli somiglianze con i cambiamenti istopatologici osservati nella malattia umana.

Il modello di fibrosi cutanea indotta da bleomicina mima le alterazioni infiammatorie che si manifestano nelle fasi precoci della SSc umana ed è estremamente facile da riprodurre. Nonostante ciò, esso presenta numerose limitazioni, infatti non riesce a riprodurre la microangiopatia generalizzata che precede l'instaurarsi del processo fibrotico e induce solo una fibrosi cutanea localizzata (Avouac et al. 2013).



**Figura 7.** Modello di fibrosi indotta da bleomicina. Iniezioni sottocutanee giornaliere di bleomicina inducono, dopo 4 settimane, una severa fibrosi cutanea e polmonare. Le alterazioni a carico della cute rimangono localizzate nel sito di iniezione e permangono per sei settimane dal termine del trattamento. Nel pannello superiore sono mostrate una sezione di cute di controllo ed una sezione di cute trattata con la bleomicina, entrambe colorate con la tricromica di Masson; nel pannello inferiore sono invece osservabili immagini di immunohistochimica su cute trattata con il chemioterapico.

## 2. Modello murino di fibrosi cutanea e polmonare indotta da acido ipocloroso

Il ruolo dei ROS nella patogenesi della SSc è stato largamente evidenziato. E' stato infatti dimostrato che i fibroblasti dei pazienti sclerodermici ne producono grandi quantità, innescando in questo modo la sintesi di collagene (Sambo et al. 1999). Sulla base di tali dati è stata quindi recentemente proposta la creazione di un modello murino di SSc consistente nella somministrazione di acido ipocloroso (HOCl), un agente in grado di determinare la generazione di vari tipi di ROS. Tale modello è stato realizzato su topi BALB/c. Questi, sottoposti ad iniezioni sottocutanee giornaliere di HOCl per un periodo di 6 settimane, sviluppano un'estesa fibrosi sia cutanea che polmonare e presentano, nel siero, elevati livelli di anticorpi diretti contro la DNA topoisomerasi I

(anti-Sc170), caratteristica tipica della dcSSc (Servettaz et al. 2009). Le iniezioni di HOCl portano ad alterazioni infiammatorie e stimolano i fibroblasti a produrre ROS, che attraverso la fosforilazione di ERK1/2, gli conferiscono un fenotipo attivato, ne inducono la differenziazione in miofibroblasti e ne stimolano la produzione di collagene di tipo I, determinando così l'instaurarsi della fibrosi (Batteux et al. 2011). Nonostante il modello sia in grado di generare un effetto sistemico e sia relativamente facile da mettere a punto, esso richiede comunque un'attesa di sei settimane per lo sviluppo della fibrosi e, essendo stato descritto in dettaglio solo da un gruppo di ricerca, richiede un'ulteriore validazione.

### **3. Modello murino di fibrosi cutanea e polmonare indotta da topoisomerasi I e adiuvante completo di Freund**

Recentemente messo a punto da un gruppo di ricerca giapponese su topi C57BL/6, questo modello inducibile di dcSSc consiste nell'eseguire, a distanza di due settimane ciascuna, quattro iniezioni sottocutanee di topoisomerasi I e di adiuvante completo di Freund, un'emulsione di acqua e oli minerali in cui è presente il *Mycobacterium tuberculosis* inattivato (Yoshizaki et al. 2011). Tale trattamento induce alterazioni del sistema immunitario e fibrosi sia cutanea che polmonare. I topi iniettati mostrano elevati livelli di IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ , mentre sono caratterizzati da una ridotta espressione di IL-10. Il modello determina inoltre la produzione di anticorpi anti-DNA topoisomerasi I (anti-Sc170), riproducendo in questo modo gli aspetti patologici tipici della dcSSc. Anche in questo caso però, essendo esso stato descritto solamente da un gruppo di ricerca, si ritiene necessaria una sua ulteriore validazione.

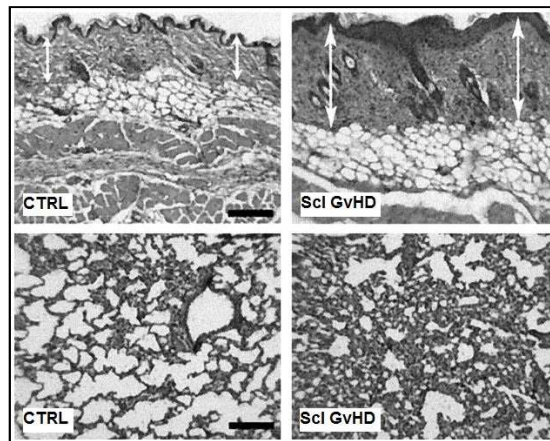
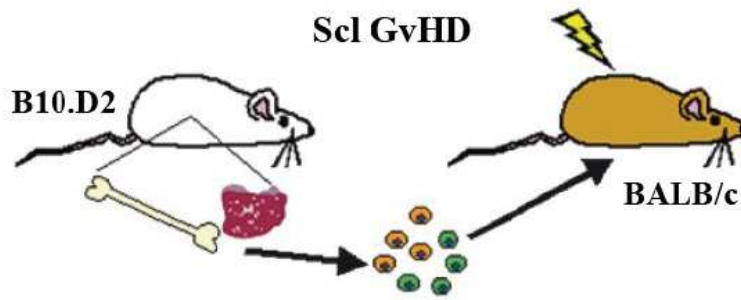
#### 4. Modello murino di malattia da rigetto del trapianto

Con malattia cronica da rigetto del trapianto (Graft-versus-Host Disease, GvHD) si intende quella condizione che si verifica, in seguito ad un trapianto di cellule staminali, quando i tessuti o le cellule del donatore vengono aggrediti dalle cellule immunitarie del ricevente. La variante fibrosante della GvHD, detta sclerodermatosi (Scl-GvHD), ha molti aspetti clinici in comune con la SSc e per tale motivo il trapianto di cellule di midollo osseo e di milza di topi B10.D2 in topi BALB/c immunosoppressi mediante irradiazione di raggi  $\gamma$  è stato proposto come modello di sclerodermia (Jaffee & Claman 1983) (Fig. 8). Due settimane dopo il trapianto si assiste ad un'infiltrazione di linfociti T, monociti e mastociti che stimolano i fibroblasti a produrre grandi quantità di ECM (Claman et al. 1985), mentre dopo tre settimane gli animali mostrano fibrosi polmonare ed ispessimento della cute, con perdita del tessuto adiposo sottocutaneo ed atrofia degli annessi cutanei (Jaffee & Claman 1983; Claman et al. 1985) (Fig. 8).

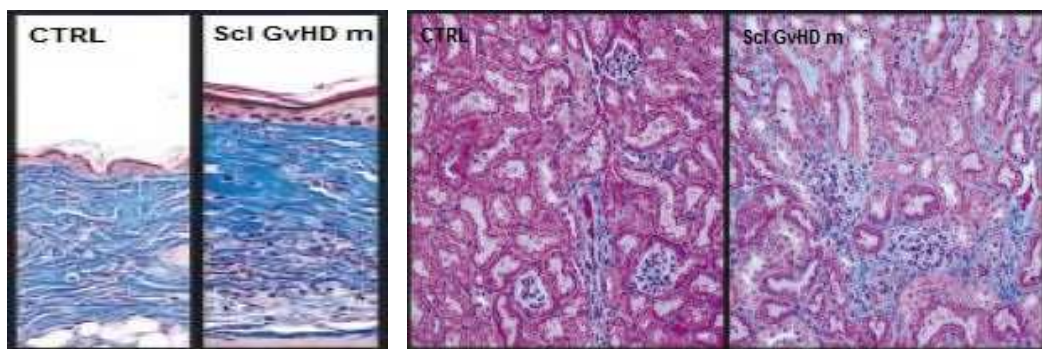
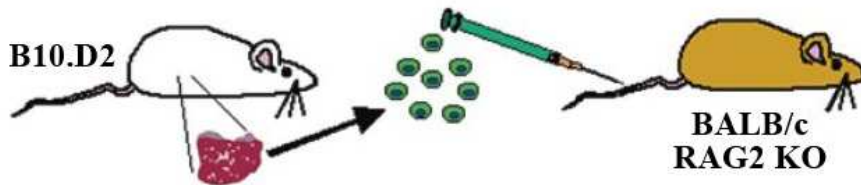
Una variante di tale modello, proposta nel 2004 da Ruzek, consiste nell'iniezione intravenosa, in topi immunodeficienti BALB/c e RAG-2 *knockout*, di sole cellule della milza di topi B10.D2 (Ruzek et al. 2004) (Fig. 8). In questo caso la fibrosi coinvolge la cute e molti organi interni (reni e tratto gastrointestinale), ma colpisce solo in minima parte i polmoni (Fig. 8).

Similmente a quanto visto per il modello di fibrosi indotta da bleomicina, anche le due varianti del modello GvHD inducono, come alterazioni predominanti, uno stato infiammatorio ed un conseguente processo fibrotico. Nonostante sia stata riportata anche la presenza di alcuni autoanticorpi, rimane tuttavia da chiarire se l'autoimmunità giochi un ruolo chiave nell'instaurarsi del processo fibrotico.





**Scl GvHD Modificato**



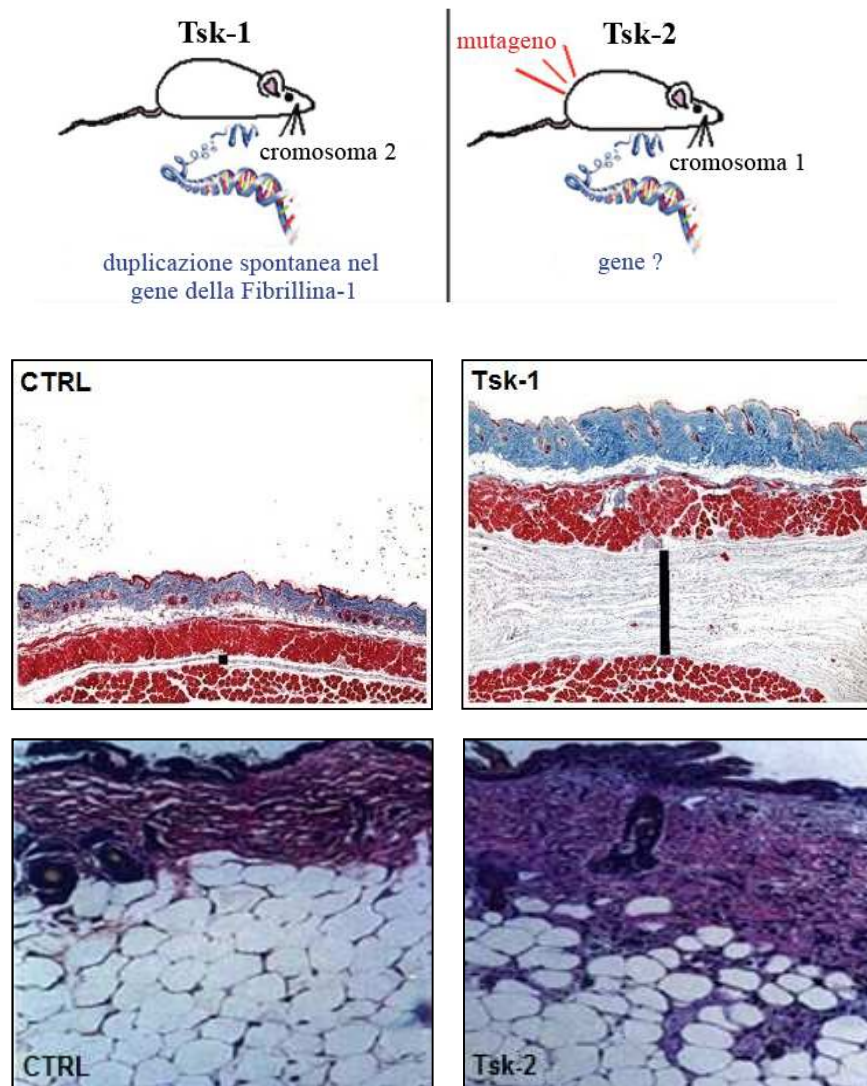
**Figura 8.** Modello di malattia sclerodermatosa da rigetto del trapianto (Scl-GvHD) e sua variante modificata. Nel primo caso si procede con il trapianto, in topi BALB/c irradiati, di cellule del midollo osseo e della milza di topi B10.D2. Le sezioni istologiche, colorate con ematossilina eosina, mostrano la fibrosi cutanea e polmonare dei topi trattati rispetto ai controlli. Nel secondo caso si esegue un'iniezione intravenosa, in topi BALB/c RAG-2 KO, di sole cellule della milza di topi B10.D2. Le sezioni istologiche, colorate con la tricromica di Masson, mostrano la fibrosi cutanea e renale dei topi trattati rispetto ai controlli.

## ***MODELLI GENETICI***

### **1. Modelli murini Tight skin-1 e Tight skin-2**

Il topo Tight skin-1 (Tsk-1) rappresenta un modello spontaneo di SSc, infatti in esso una parziale duplicazione nella regione codificante del gene della fibrillina-1, localizzato sul cromosoma 2, induce un fenotipo SSc-simile (Siracusa et al. 1996) (Fig. 9). Gli embrioni omozigoti muoiono prima della nascita, mentre quelli eterozigoti sviluppano, a 2-3 settimane di vita, un fenotipo fibrotico, caratterizzato da un diffuso ispessimento e compattamento della cute. Contrariamente a quello che accade nell'uomo però, nei topi Tsk-1 tale ispessimento non coinvolge il derma, ma l'ipoderma (Pablos et al. 2004) e non sono presenti alterazioni a carico del compartimento vascolare (Fig. 9). Anche i cambiamenti istologici rilevati a livello polmonare, inoltre, sono più somiglianti ad un enfisema che ad una fibrosi interstiziale (Manetti et al. 2010b).

La fibrillina-1 è una proteina strutturale che costituisce le microfibrille del tessuto connettivo e che ha il compito di sequestrare il TGF- $\beta$ , mantenendolo nella sua forma latente ed inattiva. Nell'uomo, il siero dei pazienti SSc presenta anticorpi circolanti anti-fibrillina-1 (Tan et al. 1999) e la cute affetta mostra ridotti livelli di fibrillina e microfibrille instabili, ossia maggiormente suscettibili alla degradazione proteolitica (Wallis et al. 2001). La mutazione che nel topo è responsabile del fenotipo tight skin comporta la formazione di una forma mutata e instabile di fibrillina, fenomeno che si pensa possa essere alla base dell'aumentato rilascio ed attivazione del TGF- $\beta$  e della conseguente eccessiva deposizione di ECM da parte dei fibroblasti (Isogai et al. 2003).



**Figura 9.** Topi Tight skin-1 e Tight skin-2. I primi presentano una duplicazione spontanea nel gene della fibrillina-1, localizzato sul cromosoma 2; i secondi sono caratterizzati da una mutazione indotta a livello del cromosoma 1. Le sezioni istologiche, colorate con la tricromica di Masson in alto e con ematossilina eosina in basso, mostrano, rispetto ai controlli, l'ispessimento dell'ipoderma nel caso del modello Tsk-1 e l'ispessimento del derma nel caso del modello Tsk-2.

Il topo Tight skin-2 (Tsk-2) presenta una mutazione autosomica dominante a livello del cromosoma 1 che è il risultato della somministrazione dell'agente mutageno etilnitrosourea (Christner et al. 1995) (Fig. 9). Questi animali sviluppano un fenotipo "tight skin" che compare dopo 3-4 settimane dalla nascita e che, all'esame istologico, mostra un marcato accumulo di collagene nel derma (Fig. 9). Oltre alla fibrosi cutanea e degli organi interni, i topi Tsk-2 presentano anche infiltrato infiammatorio cellulare e

un'ampia gamma di autoanticorpi, come gli anti-Scl70, gli ACA e gli anti-ds DNA (Gentiletti et al. 2005).

I modelli Tsk-1 e -2 sono facili da gestire e non richiedono trattamenti particolari, ma non presentano nè vasculopatia nè apoptosi endoteliale.

## **2. Topi transgenici Fra-2**

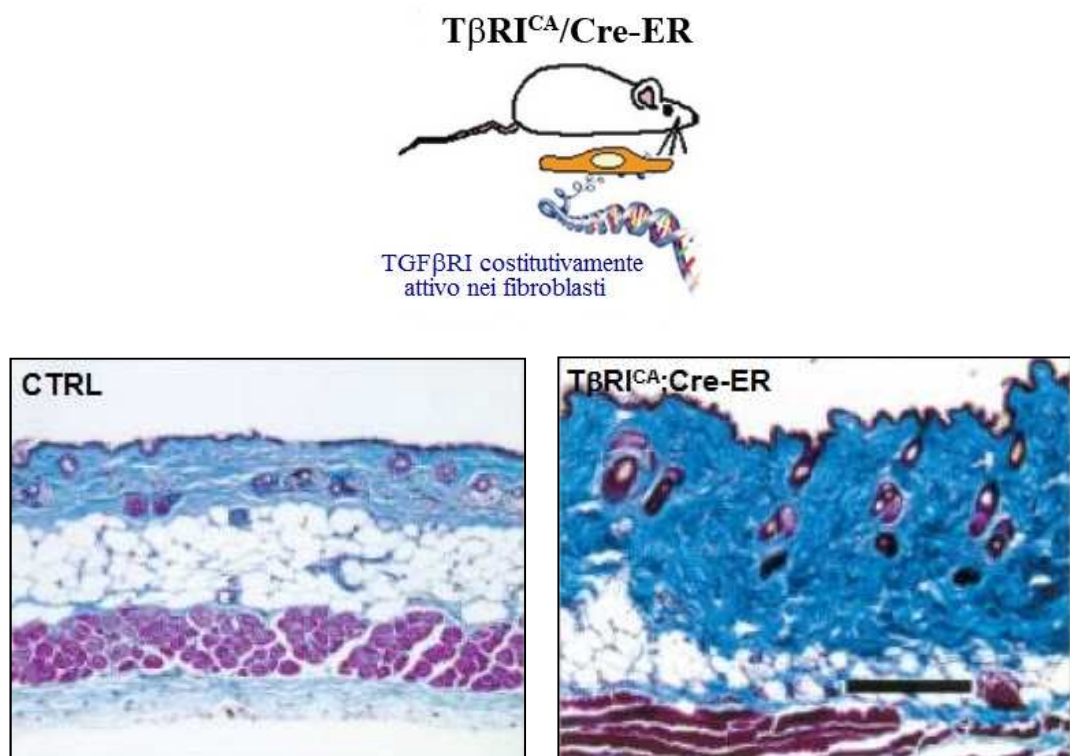
Fos-related antigen-2 (Fra-2) appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione AP-1, che sono implicati nei processi di risposta allo stress come la proliferazione, l'apoptosi, l'infiammazione, la riparazione delle ferite e la fibrosi (Avouac et al. 2012). Topi transgenici Fra-2 presentano un fenotipo polmonare caratterizzato da fibrosi e vasculopatia, con un marcato pattern proliferativo. Le prime alterazioni vascolari a comparire sono l'iperplasia neointimale, indotta dalla proliferazione delle cellule muscolari lisce dei vasi, e l'obliterazione delle arterie polmonari, che risultano accompagnate da infiammazione perivascolare (Maurer et al. 2009). In seguito si assiste ad una marcata deposizione di collagene. I topi Fra-2 sviluppano alterazioni simili anche a livello cutaneo, dove infatti si assiste a perdita del letto vascolare e a fibrosi. Il modello è quindi in grado di mimare i principali aspetti della SSc umana.

## **3. Topi T $\beta$ RI<sup>CA</sup>;Cre-ER**

Il TGF- $\beta$  rappresenta un fattore profibrotico cruciale nella patogenesi della SSc, in quanto attiva i fibroblasti ed induce la deposizione di ECM. Per tale motivo è stato recentemente proposto, come modello di SSc, quello del topo transgenico T $\beta$ RI<sup>CA</sup>;Cre-ER, in cui il signaling del TGF- $\beta$  risulta costitutivamente attivato in maniera specifica nei fibroblasti (Sonnylal et al. 2007) (Fig. 10). Questi animali sono infatti caratterizzati da una forma inducibile mutante e costitutivamente attiva del recettore di tipo I del

TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RI) e dal transgene Cre-ER, che è sotto il controllo di un enhancer specifico dei fibroblasti, Col1a2.

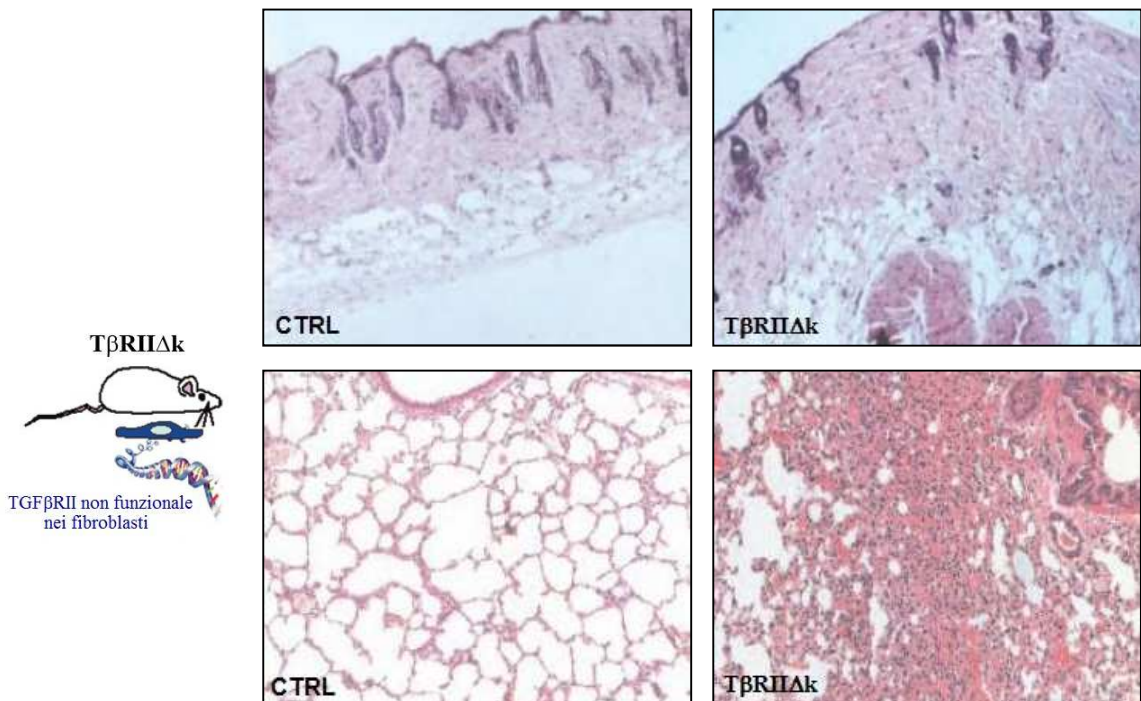
In seguito all'attivazione del signaling del TGF- $\beta$ , indotta da iniezioni ripetute di 4-idrossitamoxifene, questi topi sviluppano una progressiva e generalizzata fibrosi cutanea, con accumulo di collagene di tipo I e III. L'epidermide e gli annessi cutanei diventano atrofici ed il derma subisce numerose alterazioni strutturali (Fig. 10). Gli animali non sviluppano però nessuna fibrosi polmonare e anche i fenomeni infiammatori ed autoimmuni tipici della SSc umana risultano assenti. L'ispessimento della parete delle piccole arterie, inoltre, appare istologicamente differente da quello che si riscontra nell'uomo.



**Figura 10.** Topi transgenici T $\beta$ RI<sup>CA</sup>;Cre-ER, i cui fibroblasti esprimono un recettore I del TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RI) costitutivamente attivo. Le sezioni istologiche, colorate con la tricromica di Masson, mostrano l'ispessimento del derma nei topi T $\beta$ RI<sup>CA</sup>;Cre-ER rispetto ai controlli.

#### 4. Topi T $\beta$ RII $\Delta$ k

Ideato nel 2003, il topo T $\beta$ RII $\Delta$ k rappresenta un ulteriore modello di attivazione costitutiva del signaling del TGF- $\beta$  specifica dei fibroblasti (Fig. 11). Anche in tali animali, infatti, si fa utilizzo dell'enhancer Col1a2, che in questo caso induce l'espressione di un recettore di tipo II del TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RII) privo di attività chinastica (Denton et al. 2003). Questo, essendo dotato del solo dominio extracellulare e di quello transmembrana, può legarsi al TGF- $\beta$ , ma non è in grado di fosforilare il TGF $\beta$ RI e quindi non riesce ad innescare la trasduzione del segnale. Nonostante ciò i fibroblasti dei topi mostrano un fenotipo attivato e gli animali adulti sviluppano fibrosi cutanea, fibrosi polmonare, cardiomiopatia fibrotica e vasculopatia, soprattutto a livello polmonare e renale (Fig.11).



**Figura 11.** Topi transgenici T $\beta$ RII $\Delta$ k, i cui fibroblasti esprimono un recettore II del TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RII) privo di attività chinastica. Le sezioni istologiche, colorate con ematossilina eosina, mostrano l'ispessimento del derma e la fibrosi polmonare dei topi T $\beta$ RII $\Delta$ k rispetto ai controlli.

## Polli UCD-200/206

I polli UCD 200/206 rappresentano un modello particolarmente utile di SSc, in quanto sviluppano spontaneamente l'intero spettro delle manifestazioni cliniche che caratterizzano la patologia umana (van der Water & Gershwin 1985). A partire da 1-2 settimane dalla nascita, gli animali iniziano a presentare numerose alterazioni, tra cui occlusione vascolare, severa infiltrazione linfocitaria, fibrosi della cute e degli organi interni e presenza di autoanticorpi circolanti diretti contro antigeni nucleari e cellule endoteliali. Similmente a quanto avviene nell'uomo, inoltre, il danno endoteliale determina attivazione e conseguente apoptosi delle cellule endoteliali (Sgonc 1999). I limiti del modello risiedono nelle difficoltà e negli elevati costi di allevamento, nelle eccessive dimensioni degli animali e nella variabilità con cui questi presentano le manifestazioni cliniche della malattia.

Modello animale	Vasculopatia	Infiammazione	Autoimmunità	Fibrosi
<i>Modelli inducibili</i>				
Fibrosi indotta da bleomicina	-	+++	++	+++
Fibrosi indotta da acido ipocloroso	-	++	++	+++
Fibrosi indotta da topoisomerasi I e CFA	-	++	+++	+++
GvHD* sclerodermatoso	-	+++	++	+++
<i>Modelli genetici</i>				
Tight skin-1 (Tsk-1)	-	-	+	+++
Tight skin-2 (Tsk-2)	-	+++	+	+++
Fos-related antigen-2 (Fra-2)	+++	+++	-	+++
TβRI <sup>CA</sup> ; Cre-ER	-	+	-	+++
TβRIIΔk	+	+	-	+++
UCD-200	+++	+++	++	+++
*Malattia da rigetto del trapianto (Chronic Graft-versus-Host Disease)				

**Tabella riassuntiva.** Processi patologici chiave nella SSc e loro rappresentazione nei principali modelli animali. (Avouac et al. 2013)

### **Altri modelli murini di SSc**

La caveolina, principale costituente delle caveolae, rappresenta un importante regolatore negativo del signaling del TGF- $\beta$ , in quanto permette l'internalizzazione e la successiva degradazione dei suoi recettori di membrana. Basandosi su tale dato sperimentale, nel 2001 è stato proposto come modello di SSc l'utilizzo di topi privi del gene della caveolina 1 (Drab et al. 2001). Tali animali, infatti, a partire dalla dodicesima settimana di età, sviluppano sia modificazioni vascolari che alterazioni fibrotiche a livello dei polmoni e della cute (Drab et al. 2001).

Tra gli altri modelli murini meritevoli di nota si ricordano poi i topi transgenici che sovraesprimono il CTGF nei fibroblasti (Sonnylal et al. 2007), i topi MRL/lpr privi del recettore dell'interferone  $\gamma$  (MRL/lpr-IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) (Le Hir et al. 1999) e i topi *knockout* per il gene della relaxina (RLX<sup>-/-</sup>) (Samuel et al. 2005).



# Il Sistema Fibrinolitico e uPAR

---

L'invasività cellulare è la tendenza che presentano alcune cellule a muoversi e ad aprirsi un varco nello spazio circostante, oltrepassando le barriere anatomiche che separano i diversi compartimenti tissutali. Tale capacità contraddistingue il comportamento cellulare sia in condizioni normali che patologiche e si basa fundamentalmente su due meccanismi: l'adesività cellulare e la proteolisi extracellulare. Ne sono esempi la rottura della parete del follicolo ovarico durante l'ovulazione, l'angiogenesi, il processo di riparazione delle ferite e l'invasione dei tessuti da parte delle cellule neoplastiche.

La *proteolisi extracellulare* è il meccanismo di degradazione dei componenti della matrice extracellulare (ECM) ed è operata prevalentemente dal sistema di attivazione del plasminogeno, o *sistema fibrinolitico*. La distruzione mirata dei geni che codificano per i componenti del sistema fibrinolitico ha infatti rivelato il loro coinvolgimento in importanti eventi, tra cui la trombolisi, l'infiammazione, la fertilità, la migrazione cellulare, il rimodellamento tissutale, l'invasione neoplastica e la vascolarizzazione (Blasi & Carmeliet 2002).

Il plasminogeno è uno zimogeno presente nel plasma e nei fluidi extracellulari che è costituito da una singola catena polipeptidica e che viene attivato mediante un taglio proteolitico, che lo converte in plasmina. Questa, costituita da due catene polipeptidiche unite tra loro da un ponte disolfuro, è una serino proteasi tripsino-simile ad ampio spettro d'azione, attiva non solo nella degradazione dei coaguli di fibrina, ma anche nella degradazione di molti componenti dell'ECM, come la fibronectina, la vitronectina, la laminina e i proteoglicani. Mediante l'attivazione di varie metalloproteasi (MMP), inoltre, la plasmina interviene indirettamente anche nella degradazione della componente collagenica della matrice stessa (Castellino & Ploplis 2005).

Le MMP costituiscono una famiglia di proteasi zinco-dipendenti, suddivisa in gruppi a seconda della loro attività enzimatica e dei loro substrati preferenziali. In particolare si distinguono:

- Collagenasi e MMP interstiziali, che sono capaci di degradare tutti i tipi di collagene fibrillare ad eccezione del IV.
- Gelatinasi (Gel-A/MMP-2, Gel-B/MMP-9), elastasi e stromalisine, che tra i vari substrati sono in grado di degradare anche il collagene di tipo IV.

Complessivamente, l'intera famiglia delle MMP è capace di degradare tutte le principali componenti dell'ECM: i vari tipi di collagene fibrillare, la gelatina (collagene in forma denaturata), la laminina, l'elastina, la fibronectina, la vitronectina e i proteoglicani. Le MMP sono secrete come zimogeni (pro-MMP) e possono essere attivate sia grazie all'azione di proteasi extracellulari, quali la plasmina e l'attivatore di tipo urochinasico del plasminogeno, sia con un meccanismo di autoattivazione a cascata. Per tale motivo le pro-MMP devono essere tenute sotto stretto controllo dall'attività di inibitori tissutali specifici (TIMP). Oltre alle forme solubili, esistono anche forme di membrana delle MMP, dette MT-MMP, caratterizzate da un dominio transmembrana. In particolare, la MT1-MMP si lega ad un suo specifico inibitore e alla pro-Gel-A, che in questo modo viene mantenuta in uno stato inattivo. Quando proteasi extracellulari, principalmente la plasmina, rimuovono l'inibitore della MT1-MPP, ne liberano il sito attivo contenente lo zinco, rendendola così attiva e in grado, a sua volta, di tagliare e attivare la pro-Gel-A, che diventa quindi Gel-A. Con questo sofisticato meccanismo viene concentrata l'attività proteasica a livello della superficie cellulare.

Sebbene la callicreina, i fattori XI e XII della coagulazione sanguigna e una proteina batterica, la streptochinasi, siano tutti in grado di attivare il plasminogeno, con il

termine "attivatori del plasminogeno" (PA) ci si riferisce specificatamente solo a due enzimi: *l'attivatore di tipo urochinasico (uPA)* e *l'attivatore di tipo tissutale (tPA)*.

Questi sono entrambi secreti come singola catena polipeptidica, la quale viene poi attivata con un unico taglio proteolitico, che dà luogo a due catene legate da un ponte disolfuro. L'uPA a singola catena rappresenta uno zimogeno (pro-uPA) ed è quindi privo di attività proteolitica, il tPA a singola catena, invece, è in grado di esercitare una significativa attività enzimatica (Collen & Lijnen 2005). uPA e tPA, pur condividendo lo stesso substrato, il plasminogeno, mostrano differenti caratteristiche strutturali e funzionali.

uPA, o urochinasasi, è una serino proteasi di 54 kDa che catalizza la conversione del plasminogeno a plasmina mediante il taglio proteolitico di un singolo legame peptidico (Andreasen et al. 1997). uPA interagisce con il proprio recettore uPAR, situato a livello della membrana plasmatica, attraverso la sua catena A, priva di attività catalitica, permettendo in questo modo l'esposizione della catena B e del sito catalitico verso l'ambiente extracellulare, dove viene innescata una reazione proteasica a catena. L'interazione uPA-uPAR svolge dunque un ruolo fondamentale nella regolazione della proteolisi extracellulare a livello della membrana plasmatica, modulando le proprietà adesive e degradative delle cellule. La presenza di specifici recettori di membrana in grado di legare uPA, infatti, focalizza la sua attività urochinasica nella zona in cui è maggiormente richiesta l'attività proteolitica, cioè nei punti di contatto intercellulare e tra cellula ed ECM. L'interazione di uPA con uPAR risulta anche essere chemiotattica e mitogena per le cellule che esprimono uPAR.

L'urochinasasi è prodotta da molti tipi cellulari e svolge un ruolo chiave nei fenomeni fisiologici e patologici che richiedono distruzione e rimodellamento tissutale (Blasi & Carmeliet 2002).

tPA ha un peso molecolare di circa 70 kDa e viene sintetizzato quasi esclusivamente dall'endotelio. Questo enzima è una serino proteasi che, a differenza di uPA, possiede una forte affinità per la fibrina ed è molto più attivo dopo il legame alla fibrina stessa. Il suo ruolo principale è infatti quello di prevenire la formazione e l'estensione dei trombi intravascolari. Legandosi alla fibrina e attivando il plasminogeno contenuto nei coaguli di fibrina, tPA è quindi il principale responsabile della fibrinolisi (Collen & Lijnen 2005). Tuttavia, è stato dimostrato che sia topi uPA *knockout* che topi tPA *knockout* presentano una maggiore suscettibilità a fenomeni trombotici, e che soltanto topi privi di entrambi gli attivatori del plasminogeno sviluppano spontaneamente una severa trombosi, simile a quella osservabile nei topi privi di plasmina. Questi dati sembrano perciò indicare che i due enzimi possano sostituirsi l'un l'altro nella trombolisi (Carmeliet et al. 1995).

La proteolisi extracellulare operata dal sistema fibrinolitico rappresenta un meccanismo estremamente complesso di rimodellamento dell'ECM e, in quanto tale, deve essere sottoposta ad una fine regolazione. Questa avviene a più livelli:

1. Biosintesi e attivazione degli attivatori del plasminogeno, processi che sono soggetti a controllo ormonale e che sono influenzati da fattori di crescita e promotori tumorali, molti dei quali coinvolti nella proliferazione cellulare.
2. Interazione degli attivatori del plasminogeno con specifici recettori presenti sulle membrane cellulari.
3. Secrezione di inibitori specifici: sono state identificate varie proteine in grado di inibire gli attivatori del plasminogeno, tutte appartenenti alla superfamiglia delle "serpine" (inibitori delle serino proteasi).

Il principale inibitore della plasmina è l' $\alpha$ 2-antiplasmina, il cui effetto è ridotto quando la plasmina interagisce con la fibrina o con i suoi recettori cellulari (Castellino & Ploplis 2005).

La formazione di plasmina a partire dal plasminogeno circolante e tissutale può essere invece inibita dall'azione degli inibitori degli attivatori del plasminogeno (PAI), di cui il PAI-1 è il più efficiente. Questo è secreto in forma già attiva, ma viene rapidamente inattivato; il suo legame alla vitronectina plasmatica o a quella dell'ECM ne stabilizza invece la conformazione attiva (Dellas & Loskutoff 2005). Un altro inibitore, il PAI-2, ha un'efficienza inferiore rispetto al PAI-1 e mostra, rispetto ad esso, una minore specificità, in quanto la sua forma non glicosilata sembra essere coinvolta anche nella regolazione di enzimi intracellulari e dell'apoptosi (Dickinson et al. 1995). Il blocco della via di attivazione del plasminogeno è in grado di fermare tutta la cascata proteasica, mentre l'inibizione delle MMP, per mezzo di inibitori specifici, blocca i relativi enzimi, ma non ha alcuna influenza sui livelli di plasmina e su tutto il suo ampio spettro d'azione. Quindi, non solo i componenti del sistema fibrinolitico di per sé, ma anche tutti i meccanismi che permettono la loro regolazione giocano un ruolo cruciale nella proteolisi extracellulare.

Plasminogeno, tPA e uPA si legano a specifici recettori cellulari. Il plasminogeno circolante si lega alla superficie cellulare con bassa affinità ma con elevata capacità. I suoi recettori costituiscono un gruppo eterogeneo e possono essere suddivisi in tre differenti classi in base alla loro modalità di interazione con il loro ligando (Ranson & Andronicos 2003; Herren et al. 2003).

Differenti siti di legame cellulare sono stati identificati per tPA: alcuni sembrano essere coinvolti nella sua inattivazione, mentre altri, come dimostrato in cellule endoteliali e

neuronal, localizzano la sua attività proteolitica sulla superficie cellulare (Kuiper et al. 1988; Fukao et al. 1997; Verrall & Seeds 1989).

Il recettore cellulare specifico di uPA, uPAR, è stato identificato per la prima volta nel 1985 su cellule monocitarie (Vassalli et al. 1985) ed è stato poi ampiamente studiato e caratterizzato.

## **Il recettore dell'urochinasi (uPAR)**

### ***Struttura di uPAR***

Il recettore di uPA (uPAR, o CD87) è una glicoproteina che viene sintetizzata come una singola catena polipeptidica di 313 residui aminoacidici, il cui peso molecolare è di circa 55 kDa. La rimozione degli ultimi 30 aminoacidi a livello della porzione C-terminale ne permette poi il legame al glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI), che lo ancora alla superficie cellulare (GPI-uPAR) (Ploug et al. 1991).

uPAR, che viene sintetizzato a livello ribosomiale, glicosilato nell'apparato di Golgi ed infine esposto sulla membrana plasmatica, è costituito da tre domini, ognuno dei quali formato da circa 90 residui aminoacidici (D1, D2 e D3, numerati a partire dall'estremità N-terminale) (Fig. 12). Questi presentano ciascuno una struttura con tre loop adiacenti e formano un recettore che nel complesso ha una conformazione all'incirca globulare, con una cavità centrale che accoglie il ligando e la cui parte superiore, più larga, si restringe progressivamente verso il fondo (Llinas et al. 2005). Il ligando stabilisce molteplici contatti con le pareti della cavità, ed il dominio 1, costituito dai primi 87 residui aminoacidici della porzione N-terminale, svolge un ruolo predominante nella formazione del complesso uPA-uPAR (Llinas et al. 2005; Behrendt et al. 1991). I tre domini sono diversamente glicosilati e sono connessi tra loro mediante regioni linker. La regione di connessione tra D1 e D2 è estremamente suscettibile ad attività

proteolitiche, infatti *in vitro* può essere tagliata da enzimi come tripsina, chimotripsina, elastasi, catepsina G, MMP, dalla plasmina e da uPA stesso (Hoyer-Hansen et al. 1992; Andolfo et al. 2002; Beaufort et al. 2004). Il taglio proteolitico genera una forma troncata del GPI-uPAR, priva del D1, che è stata individuata sulla superficie di differenti linee cellulari ed in tessuti normali e cancerosi (Montuori et al. 2005). A seconda della proteasi che taglia il recettore e che ne può distruggere o meno la sequenza che corrisponde agli aminoacidi 88-92 e che è coinvolta nella migrazione cellulare, le forme troncate di uPAR possono differire a livello della loro porzione N-terminale (Resnati et al. 1996).

Entrambe le forme di uPAR, nativa (D1+D2+D3) e troncata (D2+D3), possono essere liberate dalla membrana cellulare, generando quindi delle forme solubili di recettore (s-uPAR). Queste sono state individuate in vari fluidi biologici, sia *in vitro* che *in vivo* (Montuori et al. 2005). In particolare, uPAR può essere rilasciato dalla membrana plasmatica per azione di fosfolipasi C o D specifiche per il GPI (Ploug et al. 1991; Wilhelm et al. 1999). La forma solubile del recettore nativo può inoltre dare luogo, per azione di MMP, catepsina G ed elastasi, alla produzione della forma solubile troncata (Montuori et al. 2005).

In virtù del suo ancoraggio alla membrana di tipo fosfatidil-inositolico, uPAR è dotato di una grande mobilità, e ciò fa sì che anche la formazione di un solo complesso uPA-uPAR possa permettere l'attivazione sequenziale, a livello della superficie cellulare, di più molecole di plasminogeno, che è associato alla membrana mediante recettori  $\alpha$ -enolasi. Grazie all'attività enzimatica di uPA, il plasminogeno viene convertito a plasmina, e quest'ultima, a sua volta, attiva il pro-uPA ad uPA, innescando così un importante circuito di amplificazione. A livello tissutale la plasmina è attiva quasi

esclusivamente in forma associata alla membrana plasmatica, perché solo in questa localizzazione è resistente all'attività del suo principale inibitore, l' $\alpha$ 2-antiplasmina.

Come altre proteine ancorate al GPI, uPAR tende ad aggregarsi, dando luogo alla formazione di cluster, in zone di membrana dette "raft lipidici", ossia aree che si presentano come strutture più rigide rispetto alle regioni circostanti e che sono ricche di glicolipidi, sfingolipidi, colesterolo e molecole di segnalazione. In diversi tipi cellulari uPAR si localizza a livello delle "caveole", invaginazioni di membrana che contengono agglomerati di molecole di segnalazione e che sono costituite dalla caveolina. Alternativamente, uPAR può trovarsi a livello degli pseudopodi di cellule che migrano in risposta ad uno stimolo chemiotattico, sulla superficie di cellule quiescenti o a livello dei contatti focali delle cellule invasive, generalmente in associazione con molecole dell'ECM, integrine, fattori di segnalazione ed elementi del citoscheletro.

### ***Ligandi di uPAR***

Tre proteine extracellulari, coinvolte nella degradazione dell'ECM e nell'adesione cellulare, sono state identificate come ligandi di uPAR: ***uPA***, la ***vitronectina*** e il ***chininogeno ad alto peso molecolare***.

***uPA*** si trova in due forme molecolari: una ad alto peso molecolare (HMW-uPA, PM 54 kDa) ed una a basso peso molecolare (LMW-uPA, PM 33 kDa), entrambe sintetizzate sotto forma di zimogeno a singola catena, detto pro-uPA (Andreasen et al. 1997). Quando pro-uPA si lega ad uPAR, l'interazione ne modifica la conformazione strutturale, rendendolo in grado di attivare, se pure con scarsa efficienza, le prime molecole di plasminogeno. La plasmina così generata taglia con alta efficienza il pro-uPA, trasformandolo in una molecola attiva formata da due catene polipeptidiche tenute insieme da un ponte disolfuro.

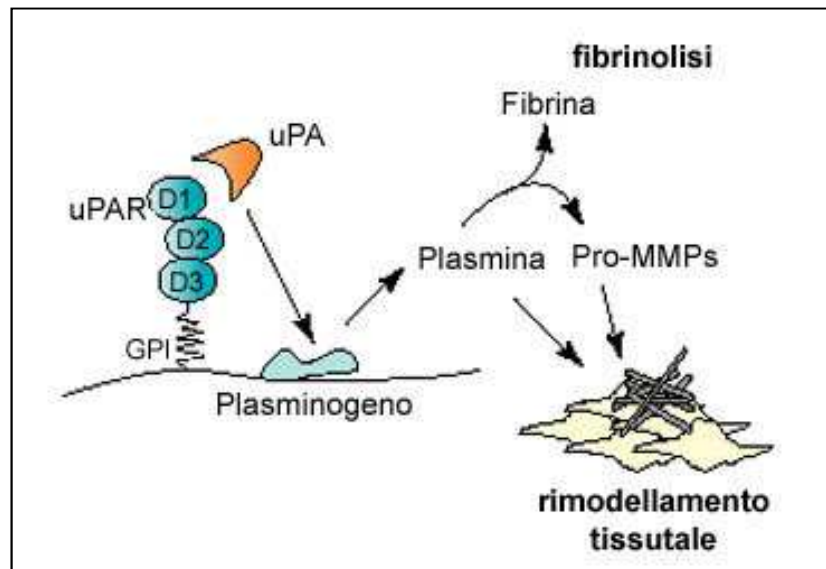


Le due catene che formano HMW-uPA prendono il nome di catena A e catena B. La prima è priva di attività catalitica e contiene la regione GF (Growth Factor like, residui aminoacidici 4-43) e la regione kringle (residui aminoacidici 47-135). Il suo frammento amino-terminale (ATF, residui aminoacidici 1-135) è in grado di legarsi ad uPAR con elevata affinità e specificità. La regione di connessione che unisce la catena A alla catena B contiene il ponte disolfuro. La catena B carbossi-terminale è invece responsabile dell'attività catalitica serino proteasica dell'enzima e non è in grado di legare il recettore (Vassalli et al. 1985). Dalla forma ad alto peso molecolare deriva, per taglio proteolitico ad opera della tripsina o di altre proteasi tripsino-simili, quella a basso peso molecolare, che consiste nel frammento carbossi-terminale contenente il sito catalitico ma incapace di interagire con uPAR.

Numerose analisi sulla struttura del recettore (Llinas et al. 2005; Behrendt et al. 1991) hanno dimostrato che il legame di uPA avviene a livello del dominio 1 N-terminale di uPAR. L'affinità di legame di uPA per il D1 è comunque risultata essere inferiore rispetto a quella per l'intero recettore, a dimostrazione del fatto che nei domini 2 e 3 sono presenti dei siti secondari importanti per stabilizzare l'interazione di uPAR con il suo ligando. La forma nativa di uPAR, costituita da tutti e tre i domini, sembra pertanto essere necessaria per un efficiente legame di uPA (Behrendt et al. 1996).

La principale funzione di uPAR è quella di legare la porzione N-terminale di pro-uPA, evento che scatena la classica cascata proteasica, portando alla degradazione della ECM: l'uPA generata attiva efficientemente il plasminogeno a plasmina, la quale a sua volta attiva le MMP della matrice, che costituiscono un sistema proteolitico per la migrazione cellulare ed il rimodellamento tissutale (Fig. 12). L'interazione di uPA con uPAR non permette soltanto questa fine regolazione del processo proteolitico, ma determina anche, in tutte le cellule che esprimono uPAR sulla membrana plasmatica

(cellule endoteliali, fibroblasti, monociti, macrofagi, cellule epidermiche, osteoblasti e cellule muscolari lisce) tutta una serie di eventi che vanno dalla chemiotassi (Fibbi et al. 1988), proliferazione (Kircheimer et al. 1987) e differenziazione cellulare (Nusrat & Chapman 1991), alla secrezione autocrina di uPA (Fibbi et al. 1990). Il principale substrato di uPA è il plasminogeno, ma ne sono stati identificati anche altri, come il fattore di crescita degli epatociti (HGF) e le proteine stimolanti i macrofagi (MSP). Queste sono molecole che hanno notevoli omologie di sequenza con il plasminogeno e che dopo il clivaggio da parte di uPA acquisiscono attività di fattori di crescita, divenendo così in grado di stimolare la proliferazione cellulare.



**Figura 12: Il sistema uPA/uPAR e l'attivazione del plasminogeno.** Il legame di uPA ad uPAR focalizza la sua attività a livello della membrana plasmatica e permette l'attivazione del plasminogeno legato alla superficie cellulare. La plasmina così generata è responsabile della lisi dei coaguli di fibrina (fibrinolisi) ed attiva le pro-MMP, innescando una cascata proteolitica che è alla base di importanti fenomeni di rimodellamento della ECM, in condizioni sia fisiologiche che patologiche.

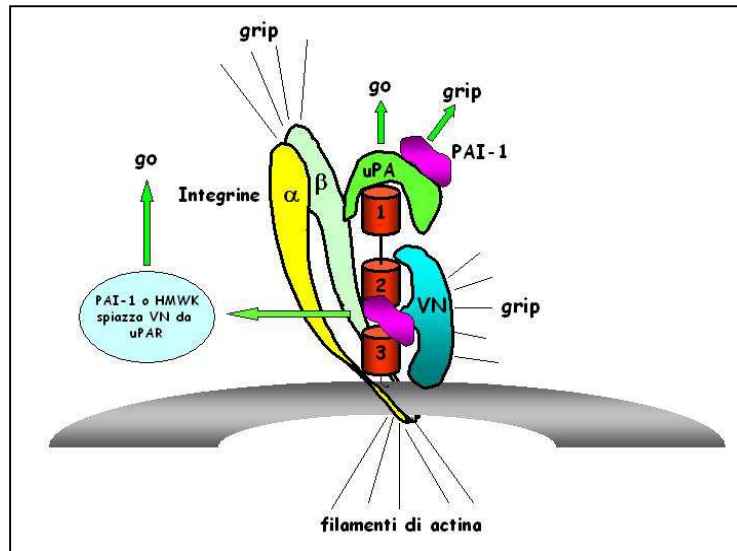
Un altro efficiente ligando di uPAR, il cui legame avviene in un sito che sembra essere localizzato tra D2 e D3, è la *vitronectina* (VN) dell'ECM. L'interazione uPA-uPAR aumenta l'affinità sia per la forma solubile che per la forma immobilizzata di tale proteina (Kanase et al. 1996) e sembra che il dominio 1 del recettore contribuisca alla

stabilizzazione di questa interazione (Sidenius & Blasi 2000). uPA regola positivamente il legame della vitronectina ad uPAR, inducendo probabilmente la formazione di dimeri di uPAR che, rispetto ai monomeri, esibiscono una maggiore affinità per la vitronectina stessa. Dal momento che la vitronectina è una molecola strutturale dell'ECM, questo tipo di legame conferisce ad uPAR la possibilità di "fare presa" sulla matrice extracellulare, permettendo quindi il "grip" (adesione) richiesto per la migrazione cellulare. Secondo l'ipotesi del "grip and go" (Fig. 13), la migrazione cellulare può infatti essere considerata come una serie di fasi alternate di attacco ("grip") e distacco ("go") della cellula dai componenti dell'ECM. PAI-1, principale inibitore dell'attivatore del plasminogeno, agisce come fattore antiadesivo (Kanase et al. 1996), infatti blocca l'interazione tra uPAR e la vitronectina competendo per il legame con quest'ultima. In questo modo vengono distrutti i siti di attacco della cellula all'ECM e viene quindi direttamente inibita l'adesione cellulare. Al contrario, l'interazione di PAI-1 con uPA blocca tutta la cascata proteasica e favorisce quindi il mantenimento dei siti di adesione richiesti per "fare presa" sull'ECM. Il ruolo bivalente di PAI-1, pertanto, contribuisce in larga misura al dualismo del sistema uPA/uPAR/PAI-1 che è alla base dell'adesività cellulare e della degradazione della matrice (Fig. 13).

Infine, uPAR lega con alta affinità anche la forma a doppia catena del chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK), con un legame zinco-dipendente che ha l'effetto di rompere la sua interazione con la vitronectina ("go"). Il chininogeno, quindi, agisce come fattore antiadesivo (Chavakis et al. 2000) (Fig. 13). Normalmente esso trasporta la callicreina, una serino proteasi che è capace di attivare il plasminogeno. La callicreina legata al chininogeno ad alto peso molecolare, infatti, può attivare il pro-uPA legato ad uPAR, fornendo così un meccanismo di attivazione di pro-uPA alternativo a quello della plasmina. L'attività combinata del chininogeno (competizione con l'interazione

uPAR-vitronectina) e della callicreina (attivazione del plasminogeno) determina quindi un effetto di completo distacco cellulare dall'ECM.

Per molti anni, l'unica funzione di uPAR è stata considerata quella di legare uPA, concentrandone l'attività proteolitica sulla superficie cellulare. Successivamente numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che sia uPA che la vitronectina sono in grado di indurre, mediante la loro associazione ad uPAR, un signaling intracellulare che è indipendente dall'attività proteolitica e che regola l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare (Blasi & Carmeliet 2002; Ossowski & Aguirre-Ghiso 2000). Il signaling intracellulare dipendente dalle interazioni uPA-uPAR e vitronectina-uPAR non può essere mediato direttamente da uPAR, in quanto questo è legato alla membrana cellulare mediante il GPI e manca di una regione transmembranaria. Per la trasduzione del segnale di "grip and go" negli eventi di migrazione cellulare, pertanto, uPAR necessita di associazioni funzionali con partner dotati di un dominio citosolico. Al momento, i migliori candidati a svolgere la funzione di "collaboratori" o co-recettori di uPAR sono le integrine, proteine eterodimeriche che presentano stretti rapporti con i filamenti di actina del citoscheletro e che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della migrazione cellulare.



**Figura 13: Ligandi di uPAR e loro ruolo nel “grip and go”.** I tre domini di uPAR sono numerati a partire dall'estremità N-terminale. Il D1 è rappresentato come l'unico coinvolto nel legame con uPA, ma anche il D2 e il D3 partecipano a tale legame, stabilizzandolo. Il legame uPA-uPAR focalizza l'attività proteasica di uPA sulla superficie cellulare (“go”), e l'inibitore PAI-1 può inibire tale attività (“grip”). Il legame di uPAR alla vitronectina (VN) svolge un ruolo importante nell'adesione cellulare all'ECM (“grip”). Il chinogeno ad alto peso molecolare (HMWK) e PAI-1 possono spiazzare la VN dall'interazione con uPAR (“go”). L'interazione di uPAR con i recettori integrinici sembra svolgere un ruolo chiave nel signaling uPAR-dipendente alla base della migrazione cellulare.

### ***Co-recettori di uPAR***

Le ***integrine*** rappresentano un importante set di molecole capaci di interagire con uPAR sulla superficie cellulare (Fig. 13). Mediante tecniche di immunolocalizzazione, co-immunoprecipitazione e trasferimento di energia per risonanza (FRET), uPAR è stato identificato in complessi con differenti famiglie di integrine, quali le  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_5$  (Wei et al. 1996; Xue et al. 1997).

Le integrine sono recettori eterodimerici (subunità  $\alpha$  e subunità  $\beta$ ) che si legano alle molecole dell'ECM (vitronectina, fibronectina e fibrinogeno) e che presentano stretti rapporti con i filamenti di actina del citoscheletro, svolgendo un ruolo cruciale nell'adesione cellulare e quindi nella regolazione della migrazione cellulare.

Un'associazione fisica tra uPAR ed un'integrina ( $\alpha_M\beta_2$  o Mac-1) è stata dimostrata per la prima volta nei granulociti neutrofili (Xue et al. 1994). Successivamente, la presenza di uPAR e di integrine  $\beta_2$  è stata identificata in complessi recettoriali di membrana che includono anche molecole coinvolte nel signaling intracellulare (Bohuslav et al. 1995). L'associazione di uPAR con Mac-1 promuove le funzioni adesive di Mac-1 stessa, mentre il legame di uPA ad uPAR influenza negativamente l'adesione cellulare (Sitrin et al. 1996). L'induzione dell'espressione di uPAR e di Mac-1 in monociti da parte del TGF- $\beta_1$  e della vitamina D3 conferisce a queste cellule un'adesione alla vitronectina uPAR-dipendente che è ulteriormente promossa dal reclutamento dell'integrina e che promuove, successivamente, il legame di Mac-1 al fibrinogeno, con la conseguente degradazione di quest'ultimo. Al contrario uPA inibisce il legame dell'integrina al fibrinogeno (Simon et al. 1996).

Il peptide M-25, che corrisponde ai residui aminoacidici 424-440 della subunità  $\alpha_M$  di Mac-1, è in grado di impedire l'associazione uPAR-integrina, competendo con quest'ultima per il legame al recettore. Ciò comporta un'inibizione dell'attività integrinica e mette in luce un importante ruolo di uPAR nella regolazione delle funzioni delle integrine  $\beta_2$  (Simon et al. 2000). Mac-1 può legarsi anche ad uPA, che compete con il fibrinogeno per il legame all'integrina, inibendo la funzione integrinica stessa (Sitrin et al. 1996). uPA può interagire simultaneamente con uPAR e Mac-1: interagisce con il primo mediante la sua regione GF, mentre riconosce Mac-1 attraverso il dominio kringle e quello proteolitico. Anche Mac-1, inoltre, è in grado di legare simultaneamente sia uPAR che uPA. Ne risulta pertanto la formazione, sulla superficie cellulare, di un complesso trimolecolare che regola la fibrinolisi e l'adesione e la migrazione cellulare (Pluskota et al. 2003).

E' stato dimostrato che l'interazione di uPAR con certi membri della famiglia delle integrine  $\beta_1$  e  $\beta_3$ , trovata specialmente a livello dei contatti focali di adesione tra cellula ed ECM (Xue et al. 1997), contribuisce a determinare una sorta di direzionalità della proteolisi extracellulare, favorendo così la migrazione e l'invasività delle cellule tumorali. L'effetto dell'associazione di uPAR con tali integrine, impegnate nel legame con i loro specifici ligandi dell'ECM, consiste nell'inibizione degli eventi normalmente promossi dal complesso integrina-ligando e risulta in una perdita dell'ancoraggio all'ECM mediato dalle integrine stesse. Più specificatamente è stato visto che se il complesso uPAR-integrine  $\beta_1$  si forma sulla membrana di cellule che presentano una limitata espressione di caveolina, tale complesso si trova localizzato in regioni aspecifiche della membrana plasmatica e si ha un'inibizione dell'adesività cellulare. Al contrario, se il complesso uPAR-integrine  $\beta_1$  si associa alla caveolina, si assiste all'attivazione di vie di trasduzione del segnale mediate dalle integrine, con il risultato di un aumento dell'adesività cellulare richiesta per la migrazione e l'invasività. Queste due alternative dipendono quindi dall'espressione della caveolina a livello della superficie cellulare. Alti livelli di caveolina e di integrine attivate promuovono la diffusione e la migrazione cellulare in molti tipi cellulari, come le cellule epiteliali e quelle tumorali metastatiche (Chapman et al. 1999).

In cellule di carcinoma mammario è stato osservato che l'associazione tra uPAR e l'integrina  $\alpha_3\beta_1$ , indotta da uPA, promuove la fosforilazione della chinasi dell'adesione focale (FAK) e la diffusione su fibronectina e collagene di tipo I (Wei et al. 2001). In contrasto, altri autori riportano che, nella stessa linea cellulare, il peptide P-25, che dissocia il complesso uPAR-integrina, è in grado di aumentare l'adesione cellulare alla fibronectina, suggerendo quindi un effetto negativo di uPAR nella regolazione delle funzioni delle integrine specifiche per la fibronectina (van der Pluijm et al. 2001).

L'associazione di uPAR con l'integrina  $\alpha_5\beta_1$  in cellule umane di carcinoma epidermico esprimenti elevati livelli di uPAR è risultata invece promuovere l'adesione cellulare alla fibronectina, accompagnata dall'attivazione di ERK1/2 (Aguirre-Ghiso et al. 1999). L'interazione uPA-uPAR sembra inoltre svolgere un ruolo importante nell'attivazione dell'integrina  $\alpha_5\beta_1$  e nell'adesione cellulare alla fibronectina. D'altra parte, la stessa integrina sembra essere richiesta per la migrazione cellulare indotta da uPA, partecipando alla trasduzione del segnale iniziato da uPA stesso (Tarui et al. 2003).

Siti di legame specifici per uPAR sono stati identificati sia nelle catene integriniche  $\alpha$  che in quelle  $\beta$  (Zhang et al. 2003a), mentre in uPAR un sito di legame per le integrine, corrispondente agli aminoacidi 130-142 (peptide D2A), è stato identificato nel dominio 2. Il peptide sintetico D2A abolisce la co-immunoprecipitazione di uPAR con le integrine  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_5\beta_1$ , indicando quindi che uPAR interagisce con entrambe le molecole a livello di questa regione (Degryse et al. 2005). L'associazione di uPAR alle integrine, come osservato per il legame di uPAR all'uPA e alla vitronectina, richiede la presenza della forma nativa (D1+D2+D3) del recettore.

L'abilità di uPAR nell'interagire con le integrine e nel regolare la loro attività sembra poi essere implicata anche nell'attivazione di specifici recettori per i fattori di crescita che, associandosi alle integrine di membrana, favoriscono una mutua collaborazione dei loro sistemi di segnalazione intracellulare. Tale collaborazione è stata dimostrata per l'integrina  $\alpha_v\beta_3$  con i recettori del PDGF, del fattore di crescita insulino simile-1 (IGF-1) e del VEGF (Comoglio et al. 2003). Vari recettori tirosino-chinasici, tra cui i recettori del fattore di crescita dell'epidermide (EGF), del PDGF, del VEGF e dell'HGF, possono essere attivati da questa integrina in assenza del loro specifico ligando (Comoglio et al. 2003). In differenti tipi cellulari è stato poi mostrato un coinvolgimento di uPAR



nell'attivazione dei recettori dell'EGF e del PDGF, "cross-talking" recettori a loro volta coinvolti nella segnalazione uPA/uPAR (Liv et al. 2002; Kiyon et al. 2005).

L'interazione di uPAR con le integrine di membrana sembra essere fondamentale anche nella regolazione dell'espressione di uPA, che a sua volta è in grado di regolare l'espressione del suo recettore (Montuori et al. 2013).

In conclusione, quindi, tutti questi dati indicano una stretta cooperazione tra uPAR e i suoi partner: l'attività delle integrine e dei recettori dei fattori di crescita richiede l'espressione di uPAR sulla superficie cellulare e, d'altra parte, quest'ultimo utilizza tali recettori per la segnalazione intracellulare che non sarebbe in grado, di per sé, di portare avanti.

### **Il sistema uPA/uPAR nella proteolisi extracellulare, nell'angiogenesi e nella fibrosi**

Il sistema uPA/uPAR svolge un ruolo fondamentale sia nel processo di proteolisi extracellulare che nel promuovere l'interazione cellulare con le molecole dell'ECM, permettendo in questo modo il "grip and go" necessario per il movimento e l'invasività cellulare. Il sistema uPA/uPAR sembra quindi contribuire in maniera rilevante ad equipaggiare la cellula endoteliale del bagaglio necessario per sostenere l'angiogenesi. Le MVEC possono infatti eseguire il processo angiogenetico solo quando presentano un appropriato apparato enzimatico che le rende capaci di lisare la ECM, degradando le sue componenti, e di invadere il tessuto circostante.

Il legame di pro-uPA ad uPAR induce l'attivazione dell'urochinasi e determina, in questo modo, la conversione del plasminogeno in plasmina. Questa svolge una duplice funzione: da una parte attiva le MMP della matrice, che iniziano il processo di degradazione dell'ECM; dall'altra, attivando ulteriori molecole di pro-uPA, amplifica la cascata proteolitica. L'attivazione del sistema uPA-uPAR, inoltre, determina un aumento della permeabilità vascolare inducendo la degradazione delle VE-caderine. Il

rilascio di PAI-1 e la conseguente formazione di complessi trimolecolari uPA/uPAR/PAI-1 rappresentano importanti meccanismi autolimitanti del processo proteolitico.

A livello della superficie delle cellule endoteliali uPAR forma dei complessi con l'integrina  $\alpha_5\beta_1$ . Lo stimolo angiogenetico indotto dal legame del VEGF al recettore VEGFR2 determina l'inattivazione delle integrine e l'attivazione, mediata dalle MMP-1 transmembranarie, delle MMP-2 della matrice che, a loro volta, danno inizio alla proteolisi extracellulare che permette alle cellule endoteliali di aprirsi un varco e di invadere il tessuto circostante (Breuss & Uhrin 2012). La stimolazione endoteliale da parte del VEGF, inoltre, porta all'internalizzazione e alla redistribuzione dei complessi uPAR/integrina  $\alpha_5\beta_1$  (Alexander et al. 2012). Il blocco dell'interazione tra uPAR e l'integrina  $\alpha_5\beta_1$  impedisce l'internalizzazione del recettore e porta ad un'inibizione della migrazione endoteliale sia *in vitro* che *in vivo* (Uhrin & Breuss 2013).

uPAR gioca un ruolo importante nella motilità e nell'adesione cellulare anche attraverso la sua interazione con la vitronectina e con recettori di membrana, che mediano il signaling intracellulare (Ragno 2006).

L'uPA richiesto per l'invasione cellulare può essere prodotto sia dalle cellule endoteliali che da altri tipi cellulari del microambiente, tra cui fibroblasti e macrofagi.

Esistono numerose prove a favore del coinvolgimento del sistema fibrinolitico nel processo angiogenetico. La distruzione mirata dei geni che codificano per uPA ed uPAR è nota causare importanti difetti nel meccanismo di vascolarizzazione (Blasi & Carmeliet 2002) ed è stato dimostrato che mentre uPA risulta essenziale per la rivascularizzazione del miocardio infartuato (Heymans et al. 1999), antagonisti di uPAR sono in grado di inibire l'angiogenesi tumorale (Rabbani & Mazar 2001). Topi uPA<sup>-/-</sup> e PAI-1<sup>-/-</sup>, inoltre, presentano una crescita tumorale ridotta e numerose alterazioni

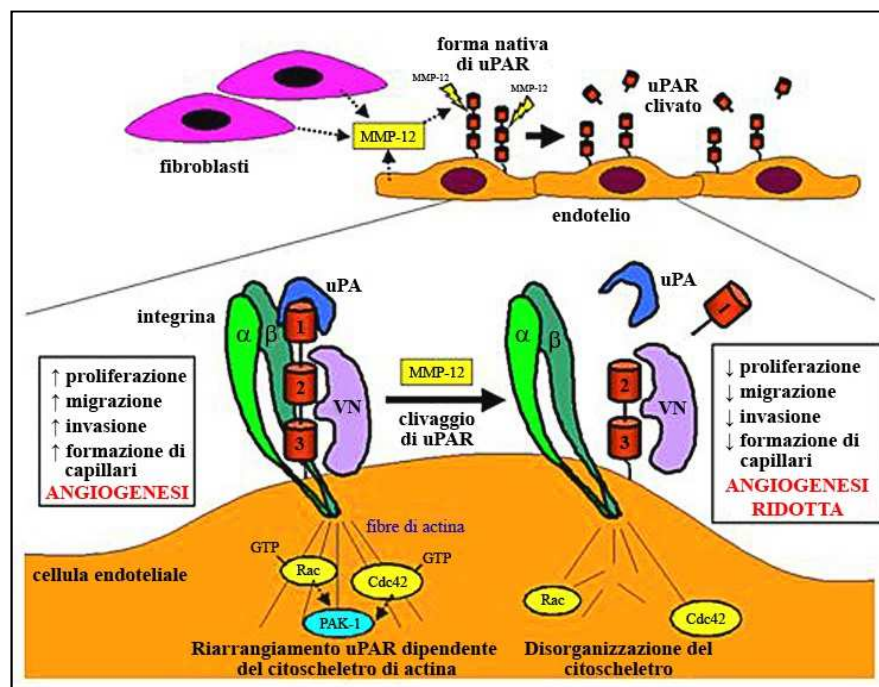
morfologiche a carico dei vasi neoformati (Gutierrez et al. 2000). Dati sperimentali mostrano poi che l'interazione tra uPA ed uPAR è in grado di promuovere, *in vitro*, la crescita, la chemiotassi e l'invasione della ECM da parte delle cellule endoteliali (Fibbi et al. 1988), mentre *in vivo*, come dimostrato nel modello sperimentale della vascolarizzazione della cornea di coniglio (Berman et al. 1982), uPA è capace di stimolare direttamente l'angiogenesi.

Un recente studio *in vitro* ha infine evidenziato che nelle MVEC isolate dal derma di pazienti SSc, uPAR subisce una troncatura tra il dominio 1 e il dominio 2 che ne riduce la funzionalità (D'Alessio et al. 2004). Tale clivaggio, che avviene ad opera della MMP-12, iperespressa dalle stesse MVEC e dai fibroblasti dermici, porta ad un'alterazione della migrazione, dell'invasione e della proliferazione delle MVEC e ad una loro incapacità di formare capillari *in vitro* su Matrigel (D'Alessio et al. 2004; Serrati et al. 2006) (Fig. 14). Il trattamento con anticorpi monoclonali anti-MMP-12 è in grado di ristabilire l'attività angiogenetica delle MVEC, inclusa la loro capacità di migrazione, chemioinvasione e formazione di vasi capillari su Matrigel (Margheri et al. 2006). E' stato inoltre dimostrato che la delezione sperimentale di uPAR (topo uPAR *knockout*) determina, sia *in vitro* che *in vivo*, una perdita delle proprietà angiogenetiche delle cellule endoteliali ed un'alterazione della loro morfologia (Balsara et al. 2011).

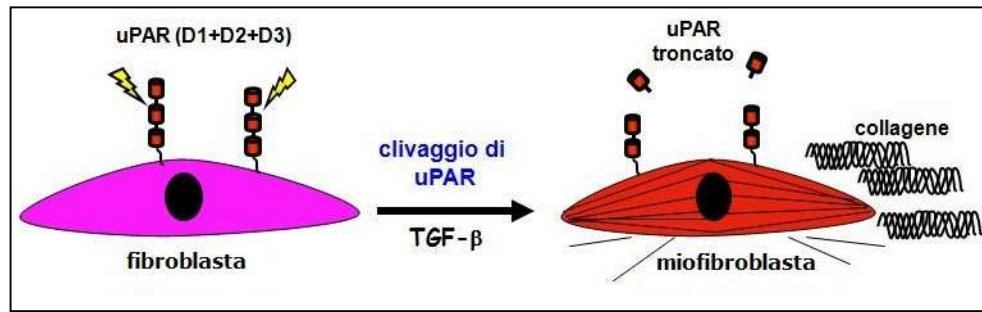
Il ruolo di uPAR nel processo di degradazione della ECM fa sì che la sua inattivazione sia implicata anche nell'instaurarsi del processo fibrotico. Topi uPAR *knockout* presentano fibrosi sia cutanea che renale (Zhang et al. 2003b; Kanno et al. 2008), mentre, a livello polmonare, topi *wild type* trattati con bleomicina mostrano un'aumentata apoptosi delle cellule alveolari, elevati livelli di PAI-1 ed una ridotta espressione di uPAR, con conseguente fibrosi polmonare (Bhandary et al. 2012). E' stato inoltre dimostrato che il clivaggio e la conseguente inattivazione di uPAR

rappresenta uno step cruciale nel processo di transdifferenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti (Hinz et al. 2012; Bernstein et al. 2007; Hinz & Gabbiani 2003) (Fig. 15).

Il legame di uPAR ad uPA previene il processo di differenziazione miofibroblastica indotto dal TGF- $\beta$ , mentre elevati livelli di integrina  $\alpha v \beta 5$  lo promuovono; l'interazione uPA-uPAR induce infatti la degradazione dell'integrina  $\alpha v \beta 5$ , regolando negativamente, in questo modo, la differenziazione dei miofibroblasti e la progressione della fibrosi (Wang et al. 2012).



**Figura 14.** Perdita delle capacità angiogenetiche delle cellule endoteliali a seguito della troncatura del recettore uPAR mediata dalla metalloproteasi 12 (MMP-12). uPAR è costituito da tre domini extracellulari ed in questa conformazione è in grado di interagire sia con uPA che con le integrine di membrana, favorendo in questo modo la degradazione della ECM e la conseguente proliferazione, migrazione ed invasione delle cellule endoteliali. A seguito del clivaggio mediato dalla MMP-12, uPAR rimane privo del dominio 1 ed, essendo pertanto incapace di legarsi ad uPA e alle integrine, determina un forte deficit angiogenetico.



**Figura 15.** Transdifferenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti indotta dal clivaggio di uPAR. Il legame della forma nativa di uPAR ad uPA previene il processo di differenziazione miofibroblastica indotto dal TGF- $\beta$ , mentre il clivaggio di uPAR, impedendo l'interazione con il suo ligando, determina la trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti e la conseguente sintesi di collagene.

## ***SCOPO DEL LAVORO***

La sclerosi sistemica (SSc), o sclerodermia, è una malattia multisistemica del tessuto connettivo che è caratterizzata da diffuse alterazioni del microcircolo periferico, con apoptosi endoteliale e perdita dei capillari, e da evoluzione fibrotica (Gabrielli et al. 2009; Varga & Abraham 2007; Manetti et al. 2010a; Bhattacharyya et al. 2011). Il distretto prevalentemente colpito dalla fibrosi è rappresentato dalla cute, mentre tra gli organi interni e gli apparati maggiormente interessati si annoverano i polmoni, il cuore e l'apparato gastrointestinale. La fibrosi polmonare, in particolare, rappresenta la principale causa di morte tra i pazienti SSc (Tyndall et al. 2010).

Nonostante i sostanziali progressi fatti nel trattamento delle complicanze dovute ai danni d'organo, ad oggi non esiste ancora nessuna cura specifica per la sclerodermia (Ong & Denton 2010).

L'utilizzo di modelli animali può rappresentare un valido strumento per una maggiore comprensione dei meccanismi patogenetici della SSc e per lo sviluppo di una terapia efficace. Nonostante ciò, la scarsa disponibilità di modelli animali in grado di ricapitolare tutti gli aspetti patologici della malattia umana rappresenta un grosso limite (Avouac et al. 2013; Manetti et al. 2010b).

Il recettore dell'attivatore di tipo urochinasico del plasminogeno (uPAR o CD87) è un componente chiave del sistema fibrinolitico, ossia quel complesso di serino proteasi che svolge un ruolo fondamentale nella degradazione della matrice extracellulare (ECM) (Ragno 2006). La forma nativa di uPAR (D1+D2+D3), che è ancorata alla membrana cellulare mediante un legame con il glicosilfosfatidil inositolo, è espressa in diversi tipi cellulari (monociti, granulociti neutrofilici, linfociti T, cellule endoteliali, fibroblasti e miofibroblasti) e concentra l'attività serino proteasica del suo ligando uPA, o urochinasasi, all'interfaccia cellula-matrice (Ragno 2006). L'interazione uPA-uPAR porta alla degradazione delle principali componenti dell'ECM sia direttamente, attraverso la

conversione del plasminogeno a plasmina, che indirettamente, mediante l'attivazione delle pro-MMP di matrice e di altre proteine (Ragno 2006). Oltre che con uPA, uPAR interagisce anche con la vitronectina e con molti membri della famiglia delle integrine di membrana, mediando in questo modo, attraverso il signaling intracellulare, numerosi processi indipendenti dall'attività proteasica (differenziazione, proliferazione, adesione e migrazione cellulare) (Ragno 2006; Blasi & Carmeliet 2002).

Studi recenti hanno dimostrato che il clivaggio di uPAR e la conseguente perdita di funzionalità del complesso uPA/uPAR a livello delle cellule endoteliali sono implicati nello sviluppo delle anomalie microvascolari e nella perdita di capacità angiogenetica che caratterizzano la SSc (D'alessio et al. 2004; Margheri et al. 2006). uPAR è infatti un importante mediatore della migrazione endoteliale e la sua inattivazione sperimentale determina, sia *in vitro* che *in vivo*, una ridotta angiogenesi ed un'alterazione morfologica delle cellule endoteliali (Balsara et al. 2011). Numerose prove sperimentali nel topo, inoltre, suggeriscono che la mancanza del gene codificante uPAR sia coinvolta nella patogenesi e nella progressione del processo fibrotico. Topi uPAR *knockout* mostrano infatti una tendenza allo sviluppo di fibrosi tissutale ed è stato dimostrato che il clivaggio e la conseguente inattivazione di uPAR rappresentano uno step cruciale nel processo di differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti, le principali cellule responsabili dell'eccessiva produzione di ECM in corso di SSc e di altre patologie a carattere fibrotico (Hinz et al. 2012; Bernstein et al. 2007; Hinz & Gabbiani 2003).

Alla luce di quanto detto, **l'obiettivo di questa tesi è stato quello di investigare se l'inattivazione del gene di uPAR, nel topo, sia in grado di riprodurre la microvasculopatia periferica e la fibrosi cutanea e polmonare che caratterizzano la SSc umana.**



## ***MATERIALI E METODI***

## **Campioni umani di cute**

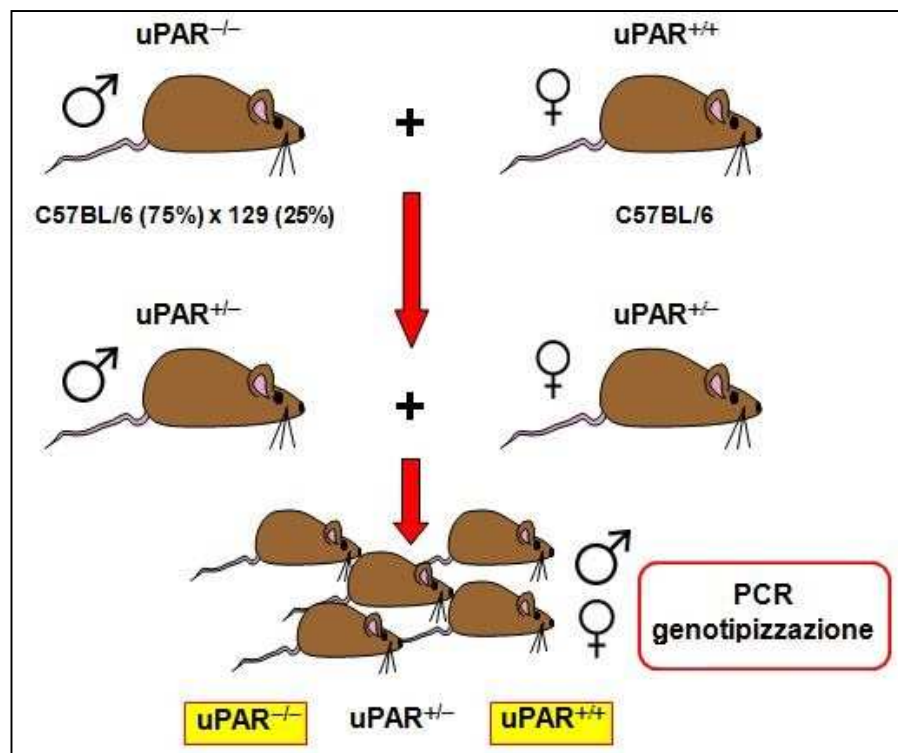
Sezioni incluse in paraffina sono state ottenute a partire da biopsie di cute affetta prelevate dall'avambraccio di 15 pazienti SSc (13 donne e 2 uomini) in cura presso la Divisione di Reumatologia del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università degli Studi di Firenze e dalla stessa regione anatomica di 10 donatori sani compatibili per età e sesso. L'età media dei pazienti era di 47 anni (range 27-69 anni), mentre la durata media della malattia, calcolata dall'insorgenza della prima manifestazione clinica (fatta eccezione per il fenomeno di Raynaud), era di 6 anni (range 1-16 anni). In accordo con i criteri di classificazione descritti da LeRoy e collaboratori (LeRoy et al. 1988), otto pazienti presentavano interessamento cutaneo limitato, mentre gli altri sette manifestavano interessamento cutaneo diffuso. Al momento del prelievo biotico nessuno dei pazienti era sottoposto a terapia immunosoppressiva o a trattamento con farmaci che potessero potenzialmente modificare l'andamento della malattia. Tutti i soggetti arruolati nello studio hanno firmato un modulo di consenso informato e lo studio è stato approvato dal comitato etico locale.

## **Allestimento e mantenimento della colonia di topi da laboratorio**

Topi maschi uPAR<sup>-/-</sup>, ossia privi del recettore dell'urochinasi a causa di una specifica delezione nel gene codificante uPAR, sono stati creati, come descritto precedentemente (Dewerchin et al. 1996), dal Dott. Peter Carmeliet (Leuven, Belgio). Questi animali, aventi un background genetico misto C57BL/6 (75%) x 129 (25%), sono stati inizialmente incrociati con femmine *wild type* (uPAR<sup>+/+</sup>) con background genetico C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Lecco, Italia), in modo tale da ottenere topi eterozigoti che, ulteriormente incrociati tra loro, hanno permesso di generare animali uPAR<sup>-/-</sup> e uPAR<sup>+/+</sup> appartenenti alla stessa colonia di allevamento. La presenza

o l'assenza del gene uPAR attivo è stata determinata mediante PCR, dopo aver estratto il DNA genomico da biopsie prelevate dall'estremità della coda degli animali (Fig. 16). Tutti i topi sono stati allevati *ad libitum* con cibo ed acqua e sono stati sottoposti ad un ritmo circadiano di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

Per gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi  $uPAR^{-/-}$  e  $uPAR^{+/+}$  di 12 settimane di età ( $n=7$   $uPAR^{-/-}$ ,  $n=7$   $uPAR^{+/+}$ ) e 24 settimane di età ( $n=7$   $uPAR^{-/-}$ ,  $n=6$   $uPAR^{+/+}$ ). Questi sono stati prima anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (400 mg/Kg) e successivamente sacrificati mediante dislocazione cervicale. I polmoni ed i campioni di cute del dorso sono stati quindi rapidamente prelevati e processati per il dosaggio dell'idrossiprolina e per le analisi istopatologiche ed immunohistochimiche. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con il DL 116/92 ed approvati dalla Commissione Istituzionale per la Cura e l'Utilizzo degli Animali da laboratorio dell'Università degli Studi di Firenze.



**Figura 16.** Allestimento della colonia di topi  $uPAR^{-/-}$  e  $uPAR^{+/+}$ .

## Metodica di genotipizzazione mediante PCR

Per l'estrazione del DNA genomico, le biopsie prelevate dalla coda di ciascun animale (1 cm di grandezza) sono state disgregate con un omogenizzatore e successivamente sottoposte ai seguenti passaggi: aggiunta del tampone di estrazione (NaCl 10mM; Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 10mM, pH 8.0) e di sodio dodecil solfato 5%; incubazione con Proteinasi K per 30 minuti a 60 °C; centrifugazione di 15 minuti a 13000 rpm; incubazione di 5 minuti del sovrantante in isopropanolo e ammonio acetato 5M; centrifugazione di 10 minuti a 13000 rpm; lavaggio del pellet e aggiunta di etanolo 70%; centrifugazione di 5 minuti e risospensione in tampone di estrazione.

Il DNA estratto è stato quindi amplificato utilizzando il kit puRE Taq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham-Biosciences). I primer impiegati per l'allele target (cassetta PGK-Neo) (Dewerchin et al. 1996), ossia quello inserito al posto del gene codificante uPAR, sono stati Neo H (5'-CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGAC-3') e Ex6R (5'-TTGATGAGAGACGCCTCTTCGGAGGAAC-3'), che producono un amplificato di 0,97 kb. Per l'allele *wild type*, invece, è stata utilizzata la coppia di primer uPARex4B (5'-GTTACCTCGAGTGTGCGTCCTGCAC-3') ed uPARex5D (5'-CCACCATTGCAGTGGGTGTAGTTGC-3'), che dà un prodotto di PCR di circa 0,78 kb.

Il protocollo di amplificazione usato ha previsto una fase di denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, 30 cicli di denaturazione (94°C per 30 secondi), annealing (55°C per 30 secondi) ed estensione (72°C per 45 secondi), ed una fase di estensione finale a 72°C per 10 minuti, usando un termociclatore TC-512 (Techne, Cambridge, UK). I prodotti della PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% contenente bromuro di etidio e visualizzati sotto un transilluminatore a raggi ultravioletti.

## **Analisi istologica dei campioni murini di cute e di polmone**

I campioni di polmone e le biopsie di cute, prelevate dalla zona superiore del dorso ed immediatamente stese su un pezzo di carta assorbente al momento del sacrificio, sono stati dapprima fissati in una soluzione tamponata di formalina al 10%, poi disidratati tramite passaggi consecutivi in alcol etilico a concentrazioni crescenti e in xilolo ed infine inclusi in paraffina. Da essi, mediante l'utilizzo di un microtomo rotativo Leica RM2255 (Leica Microsystems, Mannheim, Germania), sono state quindi ottenute sezioni di tessuto (5  $\mu\text{m}$  di spessore), le quali sono state prima sparaffinate in xilolo e poi reidratate, fino all'acqua distillata, mediante successivi passaggi in alcol etilico a concentrazioni decrescenti.

Per la colorazione istologica di base con ematossilina-eosina, le sezioni sono state colorate con ematossilina di Mayer (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) per 15 minuti, sciacquate in acqua corrente per 10 minuti, controcolorate con una soluzione acquosa di Eosina Y all'1% (Bio-Optica, Milano, Italia) per 5 minuti, disidratate in una serie alcolica a concentrazione crescente, chiarificate in xilolo ed infine montate con balsamo del Canada.

Su alcuni vetrini è stata inoltre eseguita, seguendo le istruzioni del produttore (Bio-Optica, Milano, Italia), la colorazione tricromica di Masson con blu di anilina. Questa colorazione, utilizzata per evidenziare il tessuto connettivo, sfrutta l'azione di tre diversi coloranti: l'ematossilina ferrica, che conferisce ai nuclei una tonalità nerastra; la fucsina, che colora il citoplasma di rosso; il blu di anilina, che dona al collagene ed al muco una colorazione azzurra.

Una volta colorate, le sezioni sono state osservate con un microscopio ottico Leica DM4000 B dotato sia di luce trasmessa che di fluorescenza (Leica Microsystems). Le

immagini ottenute in luce trasmessa sono state acquisite con una fotocamera digitale Leica DFC310 FX munita di software Leica LAS V3.8 (Leica Microsystems).

### **Valutazione dello spessore dermico sui campioni murini di cute**

Per la valutazione dello spessore dermico sono stati esaminati, per ciascun gruppo, due diversi campioni cutanei di ogni animale e di ogni campione sono state colorate, con ematossilina-eosina, tre sezioni. Su ognuna di esse lo spessore del derma è stato calcolato, in 5 diversi campi scelti casualmente, misurando la distanza in  $\mu\text{m}$  tra la giunzione dermo-epidermica e quella tra il derma e il tessuto adiposo sottocutaneo. Le misurazioni sono state effettuate, in cieco, da due diversi esaminatori.

### **Determinazione del contenuto di collagene nei campioni murini di cute e di polmone**

Per valutare il contenuto di collagene presente nei campioni di cute e di polmone dei topi uPAR<sup>-/-</sup> e uPAR<sup>+/+</sup> sono stati utilizzati due diversi metodi:

#### *1. Colorazione con rosso sirio picrato*

Dopo essere state sottoposte a sparaffinatura, le sezioni di cute e polmone sono state dapprima colorate, seguendo le indicazioni del produttore, con rosso sirio picrato (Bio-Optica, Milano, Italia), colorazione in grado di evidenziare le fibre collagene attraverso un legame tra il rosso sirio e i gruppi funzionali basici delle proteine tissutali. Le sezioni sono state poi disidratate in alcol etilico a concentrazione crescente, chiarificate in xilolo ed infine, dopo essere state montate, osservate con un microscopio ottico Leica DM4000 B (Leica Microsystems). In ciascuna sezione l'area positiva al rosso sirio picrato è stata misurata, utilizzando il software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA), in 5 diversi campi scelti casualmente. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto ai valori ottenuti nei topi uPAR<sup>+/+</sup>.

## 2. Dosaggio dell'idrossiprolina

La quantificazione colorimetrica del contenuto di idrossiprolina, aminoacido non standard che si trova esclusivamente nel collagene, è stata eseguita su piccole biopsie di cute e polmone (3 mm di diametro) prelevate da ogni animale di ciascun gruppo. Brevemente, i tessuti congelati sono stati disidratati, pesati ed idrolizzati in una soluzione di HCl 6N per 3 ore a 120°C. Dopo la neutralizzazione in una soluzione di NaOH 6N, i campioni sono stati quindi processati come descritto da Woessner (Woessner 1961). L'assorbanza a 560 nm è stata infine misurata in duplicato con uno spettrofotometro.

### **Analisi immunoistochimica sui campioni cutanei di uomo e di topo**

L'analisi immunoistochimica, eseguita mediante metodica di immunoperossidasi, è stata effettuata sia sulle sezioni di cute umana, per valutare l'espressione della forma nativa di uPAR (D1+D2+D3), che sulle sezioni di cute di topo. Su queste ultime gli antigeni ricercati sono stati l' $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA), utilizzata per mettere in evidenza i miofibroblasti, e la molecola di adesione cellulare piastrinico-endoteliale 1 (PECAM-1 o CD31), utilizzata invece come marcatore endoteliale specifico.

Brevemente, le sezioni sono state sparaffinate, bollite per 10 minuti in una soluzione di citrato di sodio 10 mM (pH 6.0) per lo smascheramento dell'antigene e successivamente trattate, per il blocco delle perossidasi endogene, con una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% in metanolo per 30 minuti e a 4°C. Dopo aver effettuato il blocco dei legami aspecifici con Ultra V block (UltraVision Detection System; LabVision, Fremont, California, USA), le sezioni sono state quindi incubate, per tutta la notte, in camera umida a 4°C, con i diversi anticorpi primari: l'anticorpo monoclonale di topo anti-uPAR/dominio 1 (D1) (diluizione 1:50; American Diagnostica, Stamford, Connecticut, USA), l'anticorpo

policlonale di coniglio anti- $\alpha$ -SMA (diluizione 1:100; Abcam, Cambridge, UK) e l'anticorpo policlonale di coniglio anti-CD31/PECAM-1 (diluizione 1:40; Abcam). Il giorno successivo le sezioni sono state incubate prima con l'anticorpo secondario biotinilato e poi con il complesso avidina-biotina-perossidasi (UltraVision Detection System). L'immunoreattività è stata sviluppata usando come cromogeno il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC kit, LabVision). Come controlli negativi, sezioni analoghe sono state incubate, invece che con gli anticorpi primari, con IgG inerti di corrispondente isotipo e concentrazione (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Le sezioni sono state infine esaminate con un microscopio ottico Leica DM4000 B (Leica Microsystems) e fotografate con una fotocamera digitale (Leica Microsystems).

### **Quantificazione dell'immunopositività per la forma nativa di uPAR (D1+D2+D3) nella cute umana**

In ciascun campione l'immunopositività della forma nativa di uPAR nelle cellule endoteliali e nei fibroblasti è stata quantificata, in 8 campi scelti casualmente (ingrandimento 40x), in modo semiquantitativo. (0) indicava assenza di positività; (1) positività debole; (2) positività moderata e (3) positività intensa. Due diversi esaminatori hanno eseguito la valutazione in cieco.

### **Quantificazione del numero di miofibroblasti e di microvasi nella cute di topo**

I miofibroblasti ed i microvasi sono stati identificati utilizzando rispettivamente, come marcatori, l' $\alpha$ -SMA e il CD31. I miofibroblasti  $\alpha$ -SMA positivi ed i microvasi CD31 positivi sono stati contati in 5 campi scelti casualmente (ingrandimento 40x) di ogni sezione di derma analizzata. Anche in questo caso il conteggio è stato effettuato in cieco da due osservatori indipendenti. Il risultato finale è stato espresso come media delle due diverse osservazioni effettuate.

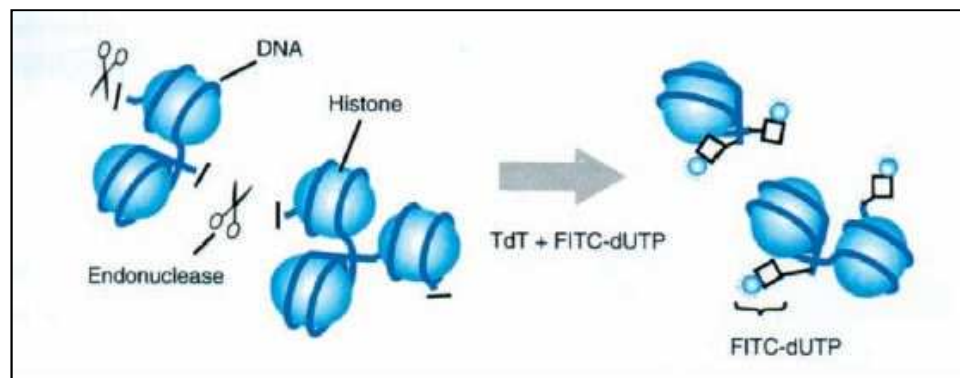


## **Immunofluorescenza per la rilevazione di citochine profibrotiche nella cute di topo**

Le sezioni cutanee di topo, dapprima sparaffinate, sono state lavate 3 volte in PBS, poi incubate per 10 minuti in una soluzione di glicina (2 mg/ml), in modo da eliminare l'autofluorescenza delle aldeidi libere, ed infine sottoposte, per 1 ora e a temperatura ambiente, al blocco dei siti di legame aspecifico. Quest'ultimo passaggio è stato effettuato utilizzando una soluzione di albumina di siero bovino (BSA) all'1% in PBS. Per la rilevazione delle citochine profibrotiche i vetrini sono stati quindi incubati per tutta la notte a 4°C con i seguenti anticorpi primari, tutti diluiti in una soluzione di BSA all'1% in PBS: anticorpo monoclonale di topo anti-TGF- $\beta$  (diluizione 1:100; Abcam); anticorpo policlonale di coniglio anti-CTGF/CCN2 (diluizione 1:200; Abcam); anticorpo monoclonale di topo anti-ET-1 (diluizione 1:100; Abcam). Il giorno seguente, dopo un lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate, per 45 minuti al buio e a temperatura ambiente, con anticorpi secondari coniugati con il fluorocromo verde Alexa Fluor-488 (diluizione 1:200; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). IgG (Sigma-Aldrich) irrilevanti di corrispondente isotipo e concentrazione sono state usate come controllo negativo. I nuclei sono stati contrastati con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI) (Chemicon International, Temecula, California, USA). I vetrini sono stati quindi allestiti utilizzando un balsamo acquoso in grado di prevenire il decadimento della fluorescenza (Biomeda Gel Mount, Electron Microscopy Sciences, Foster City, California, USA) ed infine esaminati con un microscopio ottico Leica DM4000 B (Leica Microsystems). L'analisi densitometrica dell'intensità di fluorescenza sulle immagini acquisite è stata eseguita utilizzando il software ImageJ (NIH).

## Rilevamento dell'apoptosi endoteliale nella cute di topo

Per il rilevamento e la quantificazione dell'apoptosi delle cellule endoteliali nella cute di topo è stata utilizzata, insieme all'immunofluorescenza per il marcatore endoteliale CD31, la metodica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling) (In Situ Cell Death Detection Kit; Roche Diagnostics, Mannheim, Germania). Quest'ultima consente infatti di evidenziare uno degli eventi tardivi del processo apoptotico, ossia la presenza dei frammenti di DNA prodotti dalle endonucleasi attivate dalle caspasi (Fig. 17). La metodica si basa sul principio che le terminazioni libere 3'-OH che si vengono a formare in seguito alla frammentazione del DNA possono servire come substrato per la terminal deossinucleotidil transferasi (TdT), enzima in grado di catalizzare, in assenza di un template, l'addizione di nucleotidi all'estremità 3' terminale del DNA. Utilizzando deossiribonucleotidi marcati, nel nostro caso dUTP coniugato a fluoresceina isotiocianato (dUTP-FITC), è stato quindi possibile mettere in evidenza il DNA frammentato delle cellule apoptotiche (Fig. 17).



**Figura 17.** Il principio della metodica TUNEL, in cui le estremità 3'-OH generate dalla frammentazione del DNA sono "nick end labelled" con dUTP-FITC ad opera della terminal deossinucleotidil trasferasi (TdT).

Brevemente, le sezioni sono state sparaffinate, bollite per 10 minuti in citrato di sodio 10 mM (pH 6.0), sciacquate 2 volte in PBS ed incubate al buio, per 1 ora a 37°C, con la soluzione specifica per la reazione TUNEL. Questa, in accordo con il protocollo dell'In Situ Cell Death Detection Kit, viene preparata, poco prima del suo utilizzo, diluendo la *Enzyme Solution*, contenente la TdT, nella *Label Solution*, in cui sono presenti i deossiribonucleotidi marcati (diluizione 1:10). Dopo un ulteriore lavaggio in PBS, i vetrini sono stati dapprima sottoposti al blocco dei siti di legame aspecifico con BSA all'1% in PBS e successivamente incubati, per tutta la notte e a 4°C, con l'anticorpo primario policlonale di coniglio anti-CD31 (diluizione 1:40; Abcam). IgG anti-coniglio coniugate con il fluorocromo rosso Rodamina-Red-X sono state utilizzate come anticorpi secondari. I nuclei sono stati contrastati con il DAPI (Chemicon International). La percentuale di cellule endoteliali apoptotiche è stata calcolata in modo semiquantitativo come proporzione delle cellule TUNEL/DAPI/CD31-positive rispetto a tutte le cellule DAPI/CD31-positive. In ciascuna sezione di cute il conteggio delle cellule è stato eseguito in cieco da due osservatori indipendenti, su 5 campi scelti casualmente (ingrandimento 40x). Il risultato finale è stato espresso come media delle due diverse osservazioni effettuate.

### **Analisi statistica**

Il test t di Student per campioni non correlati è stato utilizzato per l'analisi statistica. Un valore di p inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

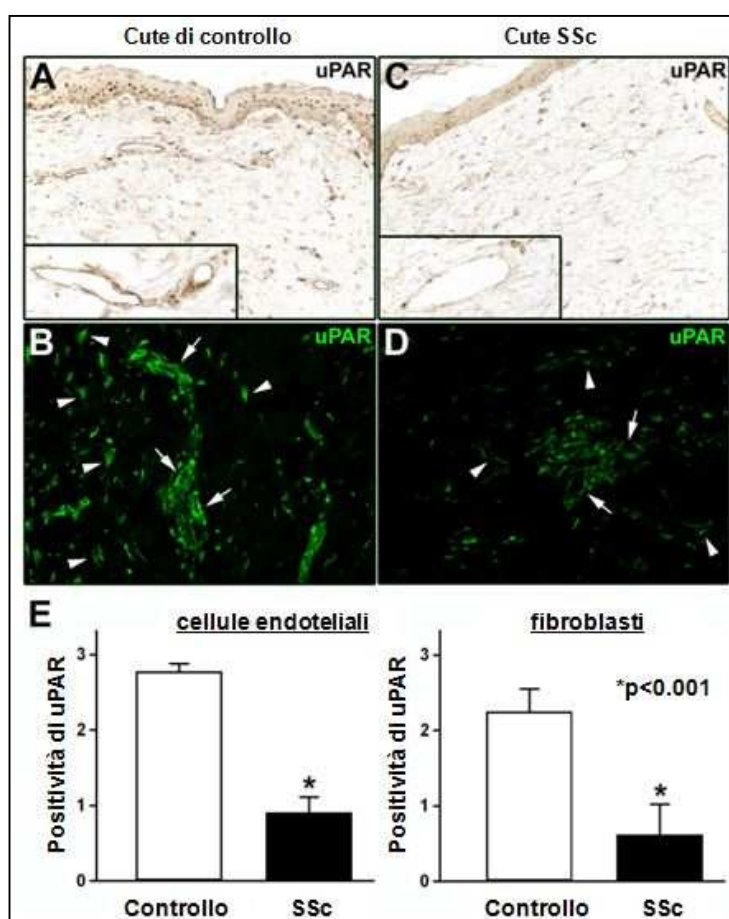
## ***RISULTATI***

## **I pazienti SSc mostrano una ridotta espressione cutanea della forma nativa di uPAR (D1+D2+D3)**

Studi recenti *in vitro* hanno evidenziato che il clivaggio e la conseguente inattivazione di uPAR sono implicati sia nel processo di differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti che nella ridotta capacità angiogenetica delle cellule endoteliali del microcircolo, entrambi eventi importanti nella patogenesi della SSc (Bernstein et al. 2007; D'Alessio et al. 2004). Miofibroblasti in coltura esprimono infatti elevati livelli della forma clivata di uPAR e l'utilizzo di inibitori di proteasi, impedendo il clivaggio del recettore, è in grado di prevenire la differenziazione miofibroblastica (Bernstein et al. 2007). Anche le MVEC isolate dal derma dei pazienti sclerodermici, se confrontate con MVEC sane, mostrano una maggiore espressione della forma clivata di uPAR. Ciò risulta essere associato ad una ridotta capacità invasiva, proliferativa e di morfogenesi capillare di queste cellule coltivate *in vitro* su Matrigel (D'Alessio et al. 2004). Il nostro gruppo di ricerca, inoltre, ha dimostrato che nelle MVEC sclerodermiche la rimozione del dominio 1 di uPAR, ad opera della MMP-12, impedisce al recettore di legarsi all'integrina  $\beta 2$  di membrana e, in conseguenza di ciò, di prendere rapporto con l'actina del citoscheletro, portando in questo modo ad una significativa alterazione del processo angiogenetico (Margheri et al. 2006). Se *in vitro* il ruolo di uPAR nella patogenesi della SSc è stato largamente studiato, i dati riguardanti un suo possibile coinvolgimento *in vivo* sono invece del tutto mancanti. Pertanto, per poter proporre il topo uPAR<sup>-/-</sup> come possibile modello di SSc umana, abbiamo ritenuto necessario dimostrare, come prima cosa, che nella cute dei pazienti sclerodermici fosse effettivamente presente una ridotta espressione della forma nativa del recettore (D1+D2+D3).

L'obiettivo iniziale di questa tesi è stato quindi quello di analizzare, mediante tecniche di immunistochemica in perossidasi ed in fluorescenza, l'espressione di uPAR in

sezioni di cute affetta di pazienti sclerodermici, a confronto con quella di controlli sani. Le nostre indagini di immunistochemica hanno messo in luce come nella cute dei pazienti SSc l'immunopositività per uPAR sia notevolmente ridotta rispetto ai controlli (Fig. 18A-D), soprattutto a livello dei fibroblasti e delle cellule endoteliali microvascolari del derma ( $p < 0,001$  per entrambi) (Fig. 18A-E). L'espressione di uPAR è risultata diminuita nei diversi stadi di malattia, senza nessuna differenza significativa tra il subset con coinvolgimento cutaneo limitato (lcSSc) e quello con coinvolgimento cutaneo diffuso (dcSSc).

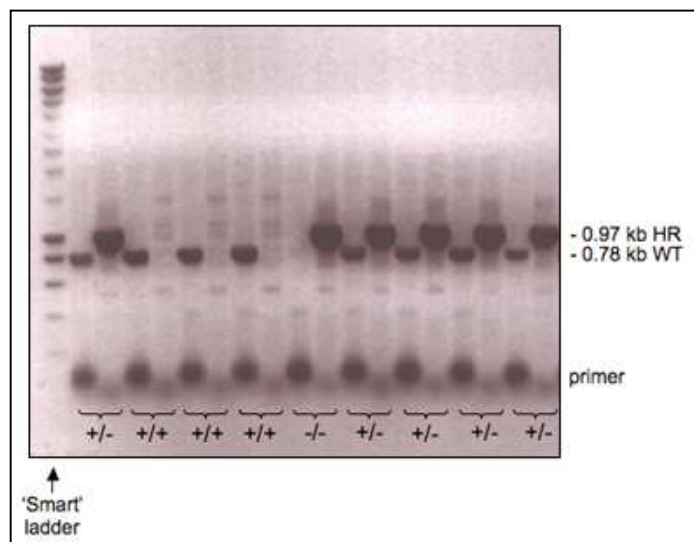


**Figura 18.** Ridotta espressione della forma nativa di uPAR (D1+D2+D3) nella cute dei pazienti SSc. Immagini rappresentative di cute sana (A e B) e sclerodermica (C e D) marcate, in perossidasi ed in fluorescenza, con l'anticorpo diretto contro il dominio 1 di uPAR. L'espressione del recettore appare notevolmente ridotta, rispetto ai controlli sani, sia a livello delle cellule endoteliali microvascolari (inserti in A e C; frecce in B e D) che dei fibroblasti (teste di freccia in B e D). Ingrandimenti: 20x (A e C); 40x (inserti); 63x (B e D). E: analisi semiquantitativa dell'espressione di uPAR nelle cellule endoteliali e nei fibroblasti del derma. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.  $*p < 0,001$  vs controlli.

## Genotipizzazione del DNA murino

Per l'allestimento della colonia di topi uPAR<sup>+/+</sup> e uPAR<sup>-/-</sup> da utilizzare negli esperimenti, topi maschi uPAR<sup>-/-</sup> sono stati fatti incrociare, inizialmente, con femmine *wild type* (uPAR<sup>+/+</sup>), in modo tale da ottenere animali eterozigoti che, ulteriormente incrociati tra loro, hanno permesso di generare topi uPAR<sup>+/+</sup> ed uPAR<sup>-/-</sup> con lo stesso background genetico ed appartenenti alla stessa colonia di allevamento. La presenza o l'assenza del gene uPAR attivo è stata determinata mediante PCR, eseguita sul DNA genomico estratto da biopsie prelevate dall'estremità della coda di ciascun animale.

Nonostante il kit di amplificazione abbia rivelato la presenza di numerose bande "fantasma", i nostri amplificati di interesse (banda *knockout* HR e banda *wild type* WT) sono risultati ben evidenti e facilmente distinguibili (Fig. 19). Come si può osservare nell'immagine, inoltre, la banda *knockout* appare sempre più intensa rispetto a quella *wild type*.



**Figura 19.** Esempio rappresentativo di una delle corse elettroforetiche su gel di agarosio a cui sono stati sottoposti i campioni di DNA genomico. Al centro sono ben evidenti la banda *knockout* (HR; 0,97 kb) e quella *wild type* (WT; 0,78 kb), mentre in basso, per ciascun campione, è indicato il risultato della genotipizzazione (+/-: eterozigote; +/+: omozigote *wild type*; -/-: omozigote *knockout*).

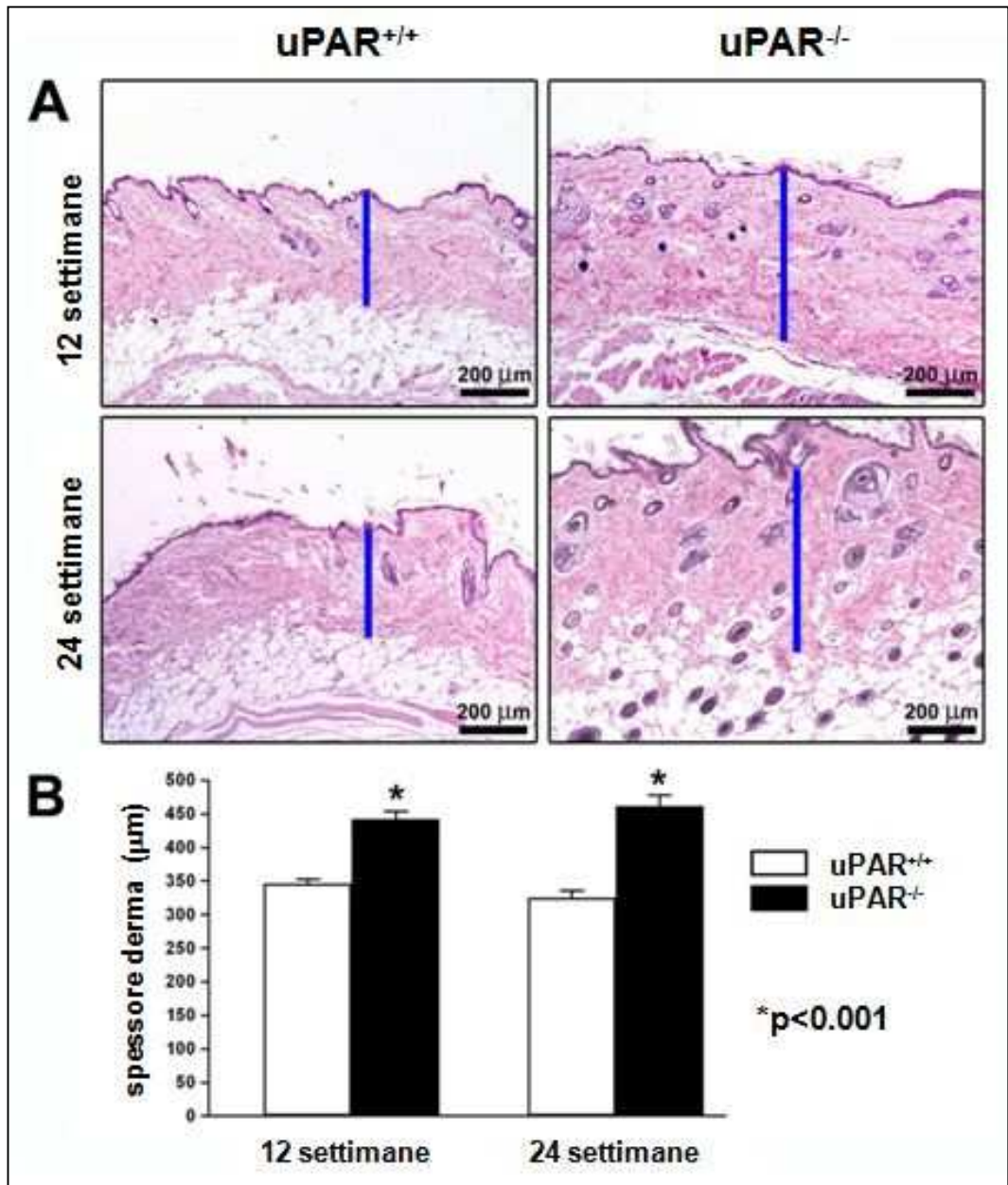
**La cute dei topi uPAR<sup>-/-</sup> è caratterizzata da ispessimento del derma, maggiore deposizione di collagene, incremento nel numero dei miofibroblasti e maggiore espressione di citochine profibrotiche**

Il grado di fibrosi cutanea degli animali è stato quantificato mediante la misurazione dello spessore dermico, calcolato come la distanza in  $\mu\text{m}$  tra la giunzione dermo-epidermica e quella tra il derma ed il tessuto adiposo sottocutaneo, e del contenuto di collagene.

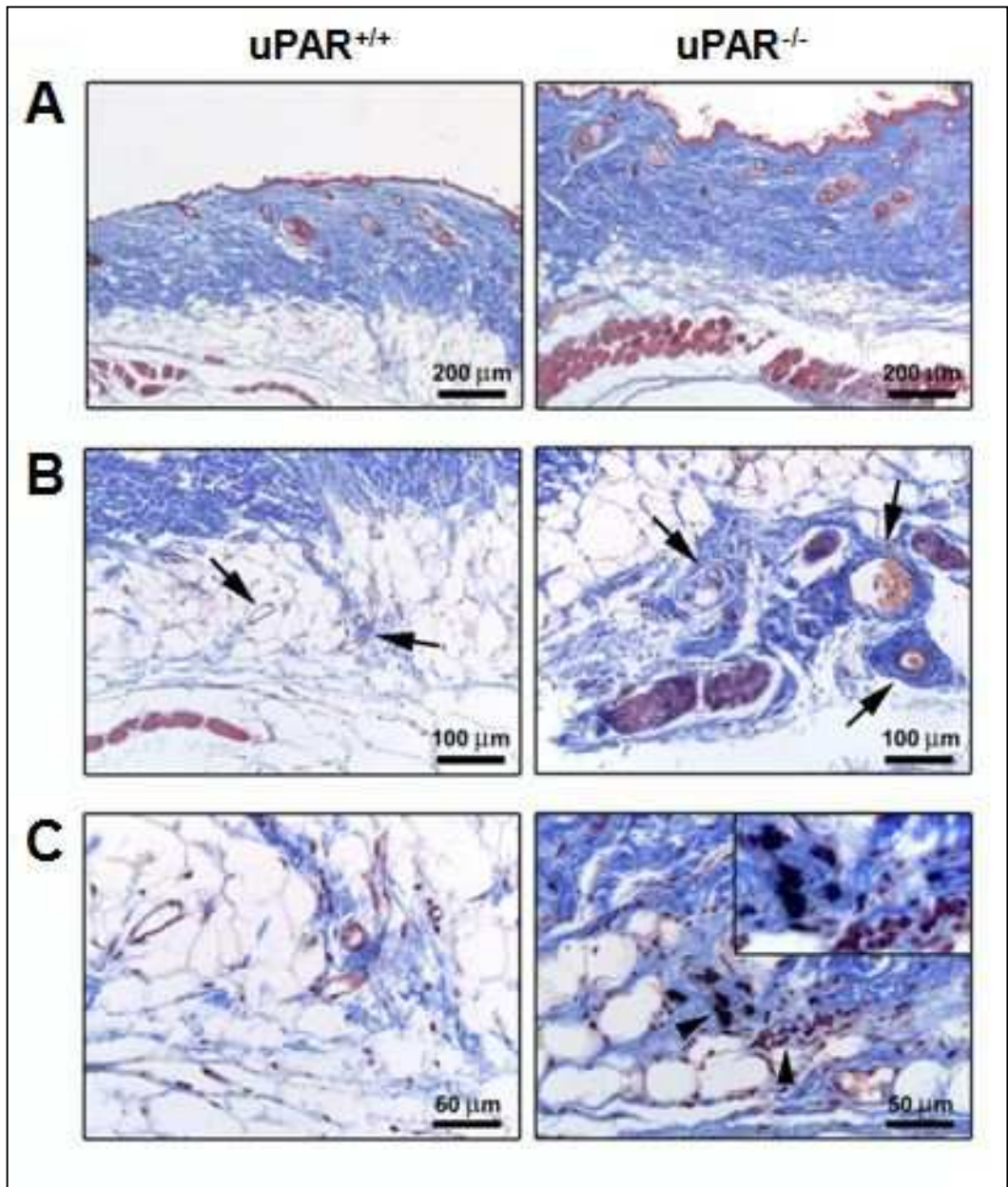
L'analisi istologica delle sezioni di cute colorate con ematossilina-eosina ha messo in evidenza, nei topi uPAR<sup>-/-</sup>, un notevole incremento dello spessore del derma rispetto ai topi *wild type* della stessa età (Fig. 20A). Tale dato è stato confermato anche dall'analisi quantitativa. Lo spessore dermico dei topi uPAR<sup>-/-</sup> è infatti risultato significativamente maggiore, rispetto a quello dei topi *wild type*, sia a 12 che a 24 settimane di età ( $p < 0,001$  in entrambi i casi) (Fig. 20B). All'interno del gruppo degli animali *knockout*, invece, non è stata riscontrata nessuna differenza significativa tra i due tempi sperimentali (Fig. 20B).

Per analizzare in modo più specifico l'organizzazione dell'ECM, le sezioni cutanee sono state poi colorate con la tricromica di Masson. Tale colorazione ha rivelato, nella cute degli animali uPAR<sup>-/-</sup>, un notevole accumulo di ECM (Fig. 21A-C) ed una parziale sostituzione del tessuto adiposo sottocutaneo da parte del tessuto connettivo, accompagnata da una severa fibrosi perivascolare (Fig. 21B, C). Negli strati più profondi del derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup> sono stati inoltre osservati alcuni foci di mastociti in degranulazione ed infiltrato infiammatorio perivascolare, specialmente a 12 settimane di età (Fig. 21C).





**Figura 20.** Aumento dello spessore dermico nella cute dei topi uPAR<sup>-/-</sup>. **A:** immagini rappresentative di sezioni di cute di topi uPAR<sup>+/+</sup> e uPAR<sup>-/-</sup>, a 12 e 24 settimane di età, colorate con ematossilina-eosina. Le barre azzurre indicano la distanza tra la giunzione dermo-epidermica e quella tra il derma ed il tessuto adiposo sottocutaneo (spessore dermico). Ingrandimento: 10x. **B:** quantificazione dello spessore dermico. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. \*p<0,001 vs topi uPAR<sup>+/+</sup>.

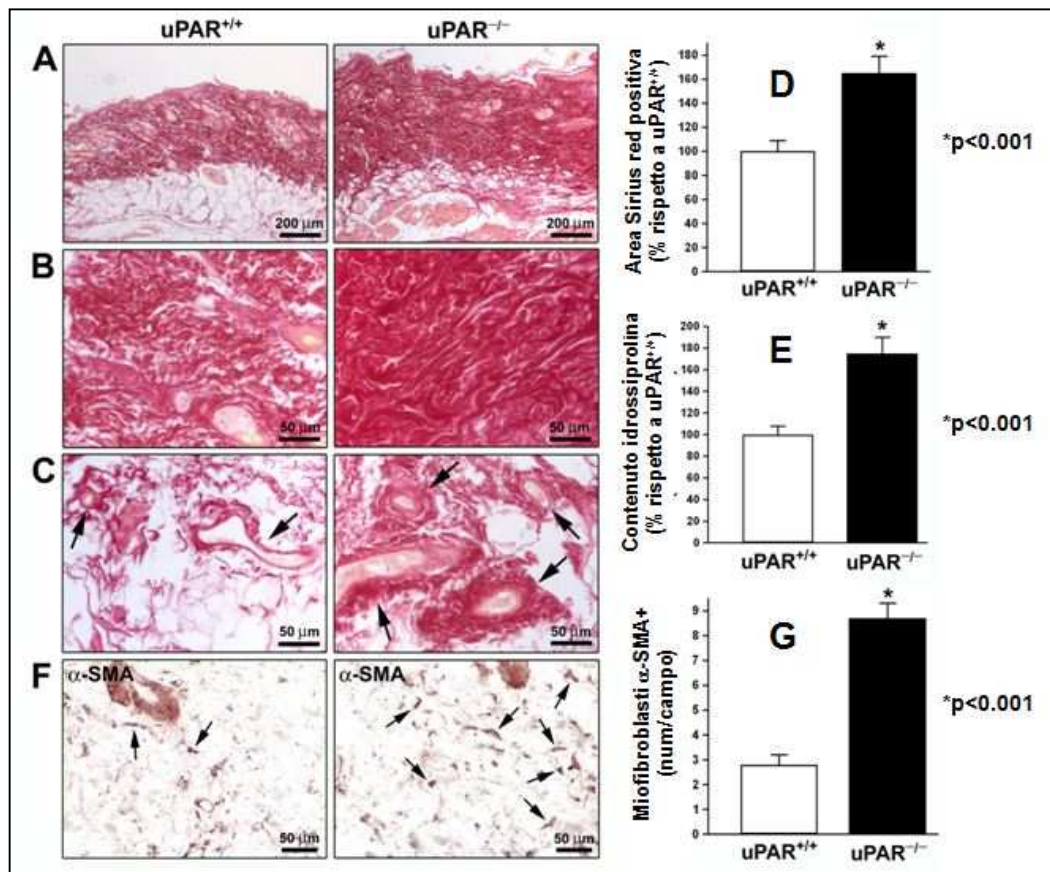


**Figura 21.** Accumulo di ECM nella cute dei topi  $uPAR^{-/-}$ . **A-C:** Immagini rappresentative di sezioni di cute di topi  $uPAR^{+/+}$  ed  $uPAR^{-/-}$  di 12 settimane di età, colorate con la tricromica di Masson con blu di anilina. La ECM appare di colore blu, i nuclei viola scuro ed il citoplasma rosso. Rispetto agli animali *wild type*, nei topi  $uPAR^{-/-}$  è evidente un accumulo di matrice (**A-C**) ed una parziale sostituzione del tessuto adiposo sottocutaneo da parte del tessuto connettivo (**B e C**). Nei topi  $uPAR^{-/-}$  sono inoltre riscontrabili una severa fibrosi perivascolare (**freccie in B**) e la presenza, negli strati più profondi del derma, di infiltrato infiammatorio perivascolare e di foci di mastociti in degranulazione (**teste di freccia in C ed inserto**). Ingrandimenti: 10x (A); 20x (B); 40x (C); 63x (inserto).

Al fine di valutare in modo ancora più approfondito l'effetto della mancanza del gene codificante uPAR sulla deposizione di ECM a livello dermico, il contenuto cutaneo di collagene nei topi uPAR<sup>-/-</sup> ed uPAR<sup>+/+</sup> è stato analizzato utilizzando due metodi indipendenti: 1) la colorazione con rosso sirio picrato, che mette in evidenza le fibre collagene attraverso un legame tra il rosso sirio ed i gruppi funzionali basici del collagene; 2) il dosaggio dell'idrossiprolina, aminoacido non standard che si trova esclusivamente nel collagene.

I risultati ottenuti con il rosso sirio picrato si sono rivelati in accordo con quelli riscontrati con la tricromica di Masson. Le sezioni di cute dei topi uPAR<sup>-/-</sup> presentano infatti sia un accumulo di fasci di collagene ispessiti e fittamente compattati in tutto il derma, sia un'abbondante deposizione di collagene, a livello perivascolare, nel tessuto adiposo sottocutaneo (Fig. 22A-C). L'analisi di immagine ha poi mostrato che l'area positiva al rosso sirio picrato è significativamente maggiore nel derma degli animali uPAR<sup>-/-</sup> rispetto a quelli uPAR<sup>+/+</sup> (p<0,001) (Fig. 22D). Analogamente, il contenuto di idrossiprolina nel derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup> è risultato aumentato in maniera significativa rispetto ai topi *wild type* (p<0,001) (Fig. 22E).

Il passo successivo è stato poi quello di analizzare, nel derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup>, la presenza dei miofibroblasti, il principale tipo cellulare responsabile dell'aumentata sintesi e deposizione di ECM in corso di fibrosi (Manetti et al. 2011b; Duffield 2012). A tale scopo, le sezioni di cute sono state sottoposte ad immunohistochimica con un anticorpo diretto contro l' $\alpha$ -SMA, attualmente considerata il miglior marcatore miofibroblastico. Similmente a quello che si riscontra nella SSc umana, nel derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup> è stato osservato un notevole incremento nel numero dei miofibroblasti  $\alpha$ -SMA positivi (p<0,001) (Fig. 22F, G).

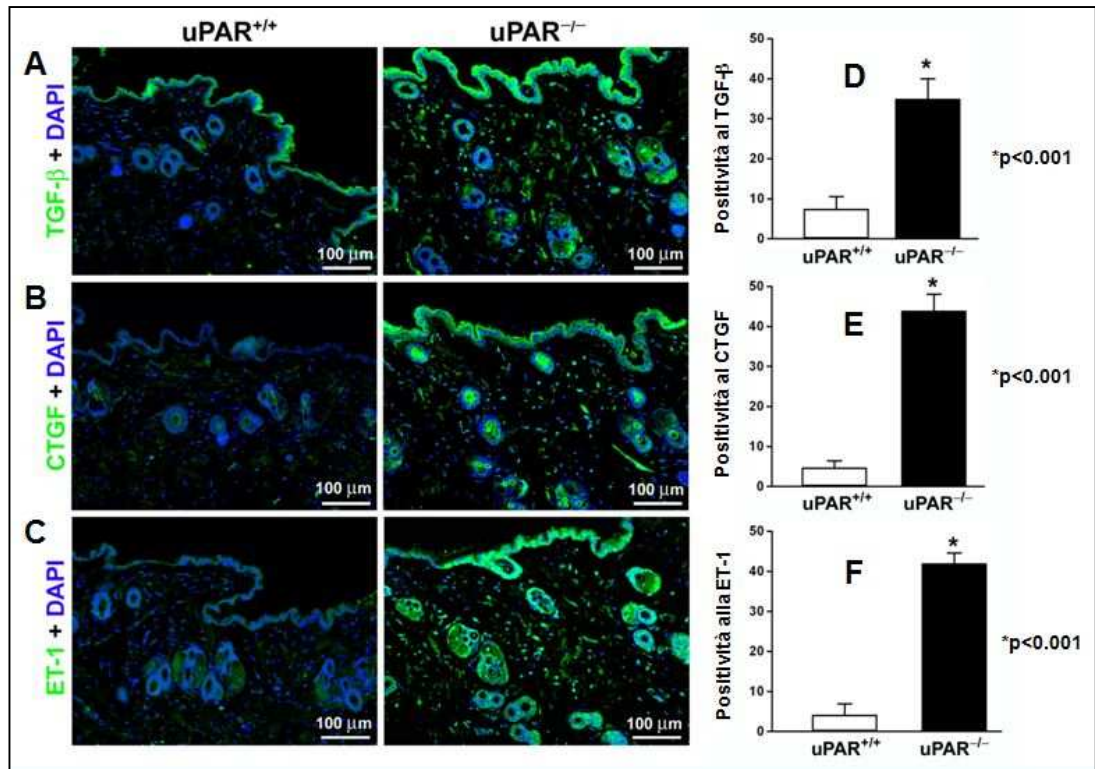


**Figura 22.** Aumento del contenuto di collagene e del numero dei miofibroblasti nella cute dei topi uPAR<sup>-/-</sup>. **A-C:** immagini rappresentative di sezioni di cute di topi uPAR<sup>+/+</sup> ed uPAR<sup>-/-</sup> di 12 settimane di età, colorate con il rosso sirio picrato. Il collagene appare di colore rosso. Negli animali uPAR<sup>-/-</sup> sono evidenti fasci di collagene ispessiti e compattati (**B**) ed un abbondante deposizione di collagene a livello perivascolare (**freccie in C**). Ingrandimenti: 10x (A); 40x (B e C). **D ed E:** quantificazione dell'area positiva al rosso sirio picrato (**D**) e del contenuto di idrossiprolina (**E**), entrambi espressi come percentuale rispetto ai valori ottenuti sui topi uPAR<sup>+/+</sup>. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. \*p < 0,001 vs topi uPAR<sup>+/+</sup>. **F:** immagini rappresentative di sezioni cutanee di topi uPAR<sup>+/+</sup> ed uPAR<sup>-/-</sup> di 12 settimane di età, marcate in perossidasi con l'anticorpo diretto contro l'α-SMA. I miofibroblasti appaiono come cellule fusiformi α-SMA positive (**freccie**). Ingrandimento: 40x. **G:** quantificazione del numero dei miofibroblasti nella cute dei topi uPAR<sup>+/+</sup> ed uPAR<sup>-/-</sup>. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. \*p < 0,001 vs topi uPAR<sup>+/+</sup>.

Mediante immunofluorescenza è stata infine valutata l'espressione di alcune delle molecole profibrotiche che sono note essere coinvolte nella patogenesi della SSc. Tale analisi ha messo in evidenza, nel derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup>, una marcata espressione delle citochine TGF-β, CTGF/CCN2 ed ET-1, espressione che appare invece molto debole o addirittura quasi assente nel derma degli animali *wild type* (Fig. 23A-C). L'analisi semiquantitativa dell'intensità di immunofluorescenza ha infatti dimostrato come queste

citochine profibrotiche siano significativamente sovraespresse nei topi  $uPAR^{-/-}$  ( $p < 0,001$ ) (Fig. 23D-F).

Nessuna differenza significativa, per nessuno dei parametri valutati, è stata riscontrata, all'interno del gruppo degli animali  $uPAR^{-/-}$ , tra le 12 e le 24 settimane di età.



**Figura 23.** Aumento dell'espressione delle citochine profibrotiche TGF- $\beta$ , CTGF ed ET-1 nel derma dei topi  $uPAR^{-/-}$ . **A-C:** immagini rappresentative di sezioni di cute di topi  $uPAR^{+/+}$  ed  $uPAR^{-/-}$  di 12 settimane di età, marcate in fluorescenza con anticorpi diretti contro il TGF- $\beta$  (**A**), il CTGF (**B**) e l'ET-1 (**C**) (verdi) e contrastate con il DAPI (blu). Ingrandimento: 20x. **D-F:** analisi densitometrica dell'immunofluorescenza. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. \* $p < 0,001$  vs topi  $uPAR^{+/+}$ .

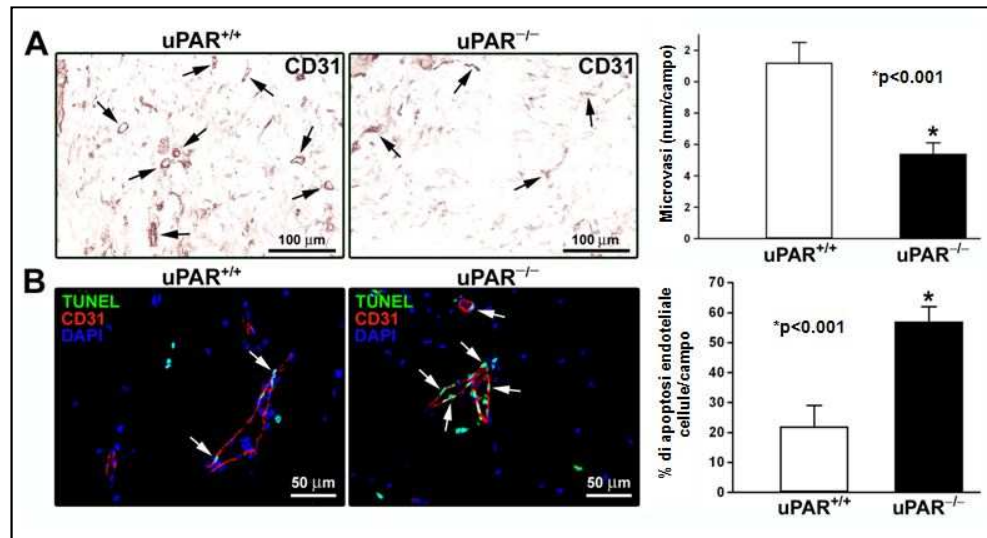
## **Il derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup> mostra un riduzione dei microvasi ed un aumentato numero di cellule endoteliali in apoptosi**

Essendo la perdita del letto microvascolare una delle caratteristiche principali della microangiopatia periferica che contraddistingue la SSc umana (Manetti et al. 2010a), un altro obiettivo di questo studio è stato quello di valutare, nella cute dei topi uPAR<sup>-/-</sup>, la densità dei microvasi, confrontandola con quella dei topi uPAR<sup>+/+</sup>. A tale scopo, le sezioni di cute sono state sottoposte ad immunohistochimica con un anticorpo diretto contro il marcatore specifico endoteliale CD31/PECAM-1. Come si può osservare nelle immagini, rispetto ai topi *wild type* gli animali uPAR<sup>-/-</sup> presentano una riduzione significativa del numero dei capillari dermici CD31 positivi ( $p < 0,001$ ) (Fig. 24A).

Considerando che l'apoptosi delle cellule endoteliali è considerata uno degli eventi più precoci nello sviluppo della microangiopatia periferica nella SSc umana, il passo successivo è stato quello di stabilire se tale processo possa giocare un ruolo chiave anche nel modello del topo uPAR<sup>-/-</sup>. Per analizzare in maniera specifica l'apoptosi endoteliale, le sezioni di cute sono state sottoposte a metodica TUNEL associata ad immunofluorescenza per il marcatore endoteliale CD31. Tale analisi ha evidenziato la presenza, nel derma degli animali uPAR<sup>-/-</sup>, di un numero significativamente maggiore di cellule endoteliali apoptotiche rispetto ai topi *wild type* di controllo ( $p < 0,001$ ) (Fig. 24B).

Nessuna differenza significativa è stata invece riscontrata, tra i topi uPAR<sup>-/-</sup> di 12 settimane di età e quelli di 24 settimane di età, né nel numero dei microvasi né in quello delle cellule endoteliali apoptotiche.

I vasi dermici degli animali uPAR<sup>-/-</sup> non presentano alcuna evidente proliferazione della tonaca intima, che invece è uno degli aspetti che si riscontra frequentemente, insieme alla scomparsa dei capillari, nella SSc.



**Figura 24.** Diminuzione della densità microvascolare ed aumento dell'apoptosi endoteliale nel derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup>. **A:** immagini rappresentative di sezioni di cute di topi uPAR<sup>+/+</sup> e uPAR<sup>-/-</sup> di 12 settimane di età, marcate in perossidasi con l'anticorpo diretto contro il marcatore pan-endoteliale CD31. I microvasi CD31 positivi sono indicati dalle frecce. Ingrandimento: 40x. Accanto è mostrata l'analisi quantitativa. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. \*p<0,001 vs topi uPAR<sup>+/+</sup>. **B:** immagini rappresentative di sezioni di cute di topi uPAR<sup>+/+</sup> ed uPAR<sup>-/-</sup> di 12 settimane di età, marcate in fluorescenza con l'anticorpo anti-CD31 (rosso) e sottoposte contemporaneamente a metodica TUNEL (verde). I nuclei sono contrastati con il DAPI (blu). I nuclei delle cellule endoteliali apoptotiche presentano una doppia marcatura verde e blu (**frecce**). Ingrandimento: 40x. L'analisi semiquantitativa ha rivelato, nel derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup>, una percentuale significativamente alta di cellule endoteliali TUNEL positive rispetto ai controlli *wild type*. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. \*p<0,001 vs topi uPAR<sup>+/+</sup>.

### I topi uPAR<sup>-/-</sup> sviluppano una fibrosi polmonare progressiva

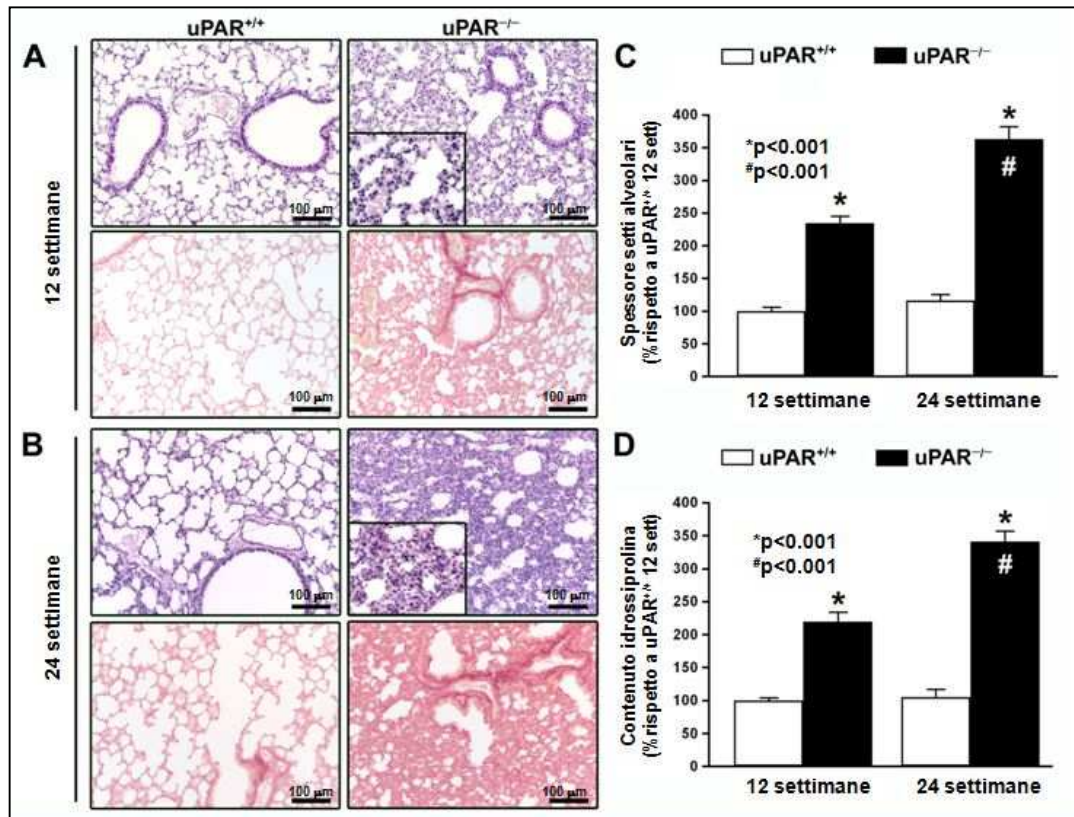
L'interessamento polmonare è tra le più frequenti ed importanti manifestazioni d'organo della SSc, è presente in circa il 70% dei pazienti ed è comunemente associato ad elevata mortalità. Per tale motivo ci siamo proposti di analizzare se, oltre alle modificazioni osservate a livello cutaneo, il modello del topo uPAR<sup>-/-</sup> possa presentare caratteristiche istopatologiche simili a quelle della SSc umana anche a livello polmonare. A tal fine, le sezioni di polmone dei topi uPAR<sup>-/-</sup> e uPAR<sup>+/+</sup> sono state colorate sia con ematossilina-eosina che con rosso sirio picrato.

I campioni di polmone dei topi uPAR<sup>-/-</sup> di 12 e 24 settimane di età mostrano le tipiche caratteristiche di una pneumopatia interstiziale aspecifica (NSIP), con estese aree di

parenchima polmonare colpite ed irregolarmente distribuite in cui è presente un coinvolgimento interstiziale uniforme caratterizzato da infiammazione diffusa ed accumulo di collagene (Fig. 25A, B). All'analisi semiquantitativa, nel polmone degli animali uPAR<sup>-/-</sup>, sia a 12 che a 24 settimane di età, lo spessore dei setti alveolari misurato è risultato significativamente aumentato rispetto ai topi *wild type*, così come il contenuto di idrossiprolina (p<0,001 ad entrambi i tempi) (Fig. 25C, D).

Nei topi uPAR<sup>-/-</sup>, inoltre, dalle 12 alle 24 settimane di età si assiste ad un notevole peggioramento della patologia polmonare, caratterizzato da un significativo incremento sia dello spessore dei setti alveolari che della deposizione di collagene, valutata mediante dosaggio dell'idrossiprolina (p<0,001 per entrambi) (Fig. 25A-D). Come già osservato a livello cutaneo, anche i vasi polmonari dei topi uPAR<sup>-/-</sup> non presentano alcuna evidente proliferazione della tonaca intima.





**Figura 25.** Sviluppo di fibrosi polmonare progressiva nei topi uPAR<sup>-/-</sup>. **A e B:** immagini rappresentative di sezioni polmonari di topi uPAR<sup>+/+</sup> ed uPAR<sup>-/-</sup> a 12 (**A**) e 24 settimane di età (**B**), colorate con ematossilina-eosina (**panelli superiori**) e rosso sirio picrato (**panelli inferiori**). Nei topi uPAR<sup>-/-</sup> estese aree di parenchima presentano le caratteristiche tipiche di una pneumopatia interstiziale aspecifica, con infiammazione interstiziale ed accumulo di collagene. Gli inserti mostrano, a maggiore ingrandimento, i setti alveolari ispessiti. Ingrandimenti: 20x (A e B); 40x (inserti). **C e D:** quantificazione dello spessore dei setti alveolari (**C**) e del contenuto di idrossiprolina (**D**), entrambe espresse come percentuale rispetto ai valori ottenuti nei topi uPAR<sup>+/+</sup>. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. \*p<0,001 vs topi uPAR<sup>+/+</sup>; #p<0,001 vs topi uPAR<sup>-/-</sup> di 12 settimane di età.

## ***DISCUSSIONE***

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che il modello di topo uPAR<sup>-/-</sup> presenta alcune delle principali caratteristiche istopatologiche della SSc umana, come la fibrosi e la perdita del microcircolo periferico a livello cutaneo e la fibrosi polmonare.

Nonostante i recenti progressi fatti nella ricerca dei meccanismi patogenetici che stanno alla base della SSc, l'eziologia di tale malattia rimane tuttora ignota. Di conseguenza, sebbene siano disponibili numerose terapie mirate contro le varie complicanze d'organo, non esistono trattamenti in grado di modificare la naturale progressione della SSc, ossia di arrestarne il processo fibrotico o la vasculopatia (Ong & Denton 2010). Gli scarsi progressi nella comprensione della patogenesi della sclerodermia e nello sviluppo di terapie innovative possono essere dovuti, in parte, alla mancanza di modelli animali in grado di mimare i principali aspetti della patologia umana, in particolare la contemporanea presenza di fibrosi e di alterazioni a carico del microcircolo periferico. I modelli sviluppati fino ad ora, infatti, manifestano solo alcune delle caratteristiche della malattia, senza riuscire a riprodurre completamente tutti gli aspetti patologici (Avouac et al. 2013; Manetti et al. 2010b). In particolare, presentano tutti una severa fibrosi cutanea, ma solo pochi mostrano vasculopatia periferica e coinvolgimento degli organi interni.

L'interazione di uPA (o urochinasi) con il suo recettore di membrana uPAR promuove il rimodellamento della ECM, l'attivazione di fattori di crescita e la migrazione cellulare. uPA è infatti una serino-proteasi extracellulare che legandosi ad uPAR, presente sulla superficie cellulare, determina l'attivazione del plasminogeno a plasmina a livello dell'interfaccia cellula-matrice. La plasmina è una proteasi a largo spettro d'azione che è in grado di degradare la fibrina ed altre proteine della ECM promuovendo, mediante l'attivazione delle MMP e di numerosi fattori di crescita, la migrazione cellulare (Ragno 2006). Oltre a determinare la formazione di plasmina, il legame di uPA ad uPAR

promuove anche l'interazione del recettore stesso con le integrine di membrana, che innescano una segnalazione intracellulare in grado di portare a migrazione cellulare e a riorganizzazione del citoscheletro (Ragno 2006; Blasi & Carmeliet 2002). uPAR è costituito da tre domini extracellulari (D1, D2, D3), il primo dei quali, che rappresenta il principale sito di legame per uPA, può venire tagliato da numerose proteasi, tra cui uPA stesso, la plasmina, la tripsina, la chimotripsina e varie MMP di matrice (Montuori et al. 2005). La forma nativa di uPAR (D1+D2+D3) può legare uPA, le integrine e la vitronectina, mentre la forma clivata (D2+D3) non è in grado di farlo. La rimozione del dominio 1 del recettore dell'urochinasi ha pertanto come conseguenze 1) l'inibizione dell'attività proteasica di uPA e della trasduzione del segnale da esso indotta; 2) la riduzione della migrazione cellulare e l'inibizione della regolazione della funzionalità integrinica mediata da uPAR, che determina aumento dell'adesione cellulare su collagene, fibronectina e laminina (Ragno 2006). L'aumento dell'adesione cellulare stimola la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti, in quanto la stabilizzazione dell'attacco della cellula alla ECM genera la tensione cellulare richiesta per l'assemblaggio dell' $\alpha$ -SMA in fibre da stress, caratteristiche dei miofibroblasti (Hinz et al. 2012; Hinz 2003). E' stato infatti dimostrato che la troncatura e la conseguente inattivazione di uPAR sono necessarie per la transizione miofibroblastica indotta dal TGF- $\beta$  e che la downregolazione di uPA o uPAR determina un aumento dell'espressione integrinica e dell'adesione al collagene, promuovendo in questo modo il fenotipo miofibroblastico persistente che innesca la fibrosi (Hinz et al. 2012; Bernstein et al. 2007; Wang et al. 2012). Oltre che sui fibroblasti, il sistema uPA/uPAR influisce anche sulla funzionalità endoteliale. uPAR fornisce infatti le cellule endoteliali di un appropriato corredo enzimatico in grado di regolare le diverse fasi di adesione e degradazione della ECM che sono necessarie per la migrazione cellulare e l'angiogenesi

(Alexander et al. 2012; Balsara et al. 2011). In questo contesto il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che nelle MVEC del derma dei pazienti SSc uPAR subisce un clivaggio, da parte della MMP-12, tra il dominio 1 ed il dominio 2 e che tale clivaggio determina un alterato riarrangiamento del citoscheletro ed una compromissione sia dell'angiogenesi che della migrazione, dell'invasione e della proliferazione cellulare (D'Alessio et al. 2004; Margheri et al. 2006). E' interessante notare, inoltre, che la neutralizzazione della MMP-12 mediante silenziamento del suo mRNA previene il clivaggio di uPAR ed è quindi in grado, in parte, di restituire alle cellule endoteliali la capacità di produrre strutture capillari *in vitro* (Margheri et al. 2010). Il nostro gruppo di ricerca ha poi evidenziato l'associazione tra una variante genica nel promotore del gene codificante uPAR e le complicazioni vascolari della SSc (Manetti et al. 2011c). In questa tesi viene inoltre dimostrato, per la prima volta *ex vivo*, che la forma nativa di uPAR (D1+D2+D3) è downregolata nella cute affetta dei pazienti SSc, specialmente a livello delle cellule endoteliali e dei fibroblasti.

Sulla base di questi dati sperimentali lo scopo del mio lavoro è stato quello di valutare se l'inattivazione sperimentale del gene uPAR, nel topo, possa rappresentare un valido modello di SSc, riproducendo sia la fibrosi che la vasculopatia periferica che la caratterizzano.

**I risultati ottenuti**, che confermano ed ampliano osservazioni precedenti (Kanno et al. 2008), mostrano che l'assenza di uPAR risulta associata, nel topo, allo sviluppo di fibrosi cutanea e **permettono pertanto di proporre il topo uPAR *knockout* come nuovo modello murino di SSc**. Nella cute degli animali uPAR<sup>-/-</sup> sono state infatti riscontrate gran parte delle principali caratteristiche patologiche della sclerodermia umana:

1) lo spessore del derma, il contenuto di collagene ed il numero dei miofibroblasti sono risultati **significativamente aumentati** rispetto ai controlli *wild type* e la cute è caratterizzata da fasci di collagene ispessiti, irregolarmente distribuiti e fittamente assemblati, da abbondante fibrosi perivascolare e da una parziale sostituzione del tessuto adiposo sottocutaneo da parte del tessuto connettivo;

2) nel derma dei topi uPAR<sup>-/-</sup> è risultata evidente una **marcata sovraespressione** delle citochine profibrotiche TGF-β, CTGF/CCN2 ed ET-1, notoriamente coinvolte nella patogenesi della SSc umana. Il TGF-β, attivando i fibroblasti e causando una potente stimolazione della sintesi del CTGF/CCN2, sia nei fibroblasti che nelle cellule endoteliali, sembra infatti giocare un ruolo importante nell'instaurarsi della fibrosi cutanea e polmonare in corso di SSc (Varga & Whitfield 2009). Anche l'ET-1 è un potente attivatore della proliferazione fibroblastica e della sintesi di ECM ed una sua aumentata produzione è stata più volte descritta nella SSc (Kahalel et al. 1991; Leask 2011). La sua presenza è inoltre necessaria per permettere al TGF-β di indurre i suoi effetti fibrotici sia *in vitro* che *in vivo* (Leask 2011);

3) similmente a quello che si riscontra nei pazienti sclerodermici, nei topi uPAR<sup>-/-</sup> i cambiamenti fibrotici a carico della cute sono accompagnati da apoptosi delle cellule endoteliali e da una severa perdita del microcircolo periferico. Tali risultati permettono quindi di affermare che il topo uPAR<sup>-/-</sup> possa rappresentare anche un **valido modello per lo studio della microvasculopatia periferica**. L'apoptosi delle cellule endoteliali è infatti da molti considerata uno degli eventi patogenetici primari della SSc (Sgonc et al. 1996) ed è stato recentemente dimostrato, in accordo con i nostri risultati, che uPA regola la sopravvivenza endoteliale e che la sua attività antiapoptotica è strettamente legata alla presenza di uPAR sulla cellula endoteliale stessa (Prager et al. 2009). Le nostre osservazioni circa la significativa diminuzione del numero dei capillari dermici

nei topi uPAR<sup>-/-</sup> sono in accordo anche con precedenti studi, che hanno dimostrato come il clivaggio e la conseguente inattivazione di uPAR siano in larga parte responsabili della compromissione della capacità angiogenetica delle MVEC nei pazienti SSc (Manetti et al. 2010a; D'Alessio et al. 2004; Margheri et al. 2006). I nostri risultati sono in linea anche con un recente studio che ha evidenziato come le cellule endoteliali isolate dal topo uPAR<sup>-/-</sup> siano incapaci, sia *in vitro* che *in vivo*, su impianti di Matrigel arricchiti con fattori di crescita, di formare strutture capillari funzionali dotate di un lume (Balsara et al. 2011);

I risultati di questo lavoro dimostrano infine, per la prima volta, che **il modello di topo uPAR<sup>-/-</sup> presenta, anche a livello polmonare, caratteristiche patologiche simili a quelle riscontrate nella SSc umana.** Il pattern istopatologico osservato è infatti paragonabile a quello di una pneumopatia interstiziale aspecifica (NSIP), con vaste aree di parenchima polmonare colpito alternate ad aree indenni e caratterizzate da un coinvolgimento interstiziale uniforme, infiammazione cellulare diffusa ed accumulo di collagene. Nessuna proliferazione dell'intima, tipica dell'ipertensione arteriosa polmonare che è presente in una parte dei pazienti SSc, è stata riscontrata a livello vascolare.

Studi recenti condotti su topi uPAR<sup>-/-</sup> hanno dimostrato che la mancanza di uPAR accelera la fibrosi renale in corso di nefropatia ostruttiva (Zhang et al. 2003b). Si ritiene quindi necessario indagare, in futuro, se il modello di topo uPAR<sup>-/-</sup> possa essere in grado di sviluppare aspetti patologici paragonabili a quelli della SSc umana anche in altri organi interni, come i reni, il cuore ed il tratto gastrointestinale.

Concludendo, i dati ottenuti permettono di affermare che l'assenza di uPAR, nel topo, è associata sia allo sviluppo di fibrosi cutanea e polmonare che alla comparsa di microvasculopatia periferica. Le caratteristiche patogenetiche osservate nei nostri

animali, quali l'incremento del numero dei miofibroblasti dermici, l'aumentata espressione dei fattori profibrotici, l'apoptosi endoteliale e la conseguente riduzione della densità capillare, sono particolarmente interessanti, in quanto potrebbero consentire di far luce sui processi analoghi che si manifestano nella SSc umana. Alla luce di tali risultati, quindi, il topo uPAR<sup>-/-</sup> potrebbe rappresentare un promettente modello preclinico sia per lo studio dei meccanismi patogenetici alla base della SSc umana che per testare l'efficacia di potenziali strategie terapeutiche in grado di ridurre lo sviluppo della fibrosi e la perdita dei capillari che caratterizza la vasculopatia periferica. I risultati di questo studio hanno inoltre dimostrato che la forma nativa di uPAR (D1+D2+D3) è notevolmente ridotta nei pazienti SSc. Tale dato, insieme alle precedenti osservazioni riguardo al coinvolgimento del clivaggio di uPAR nella differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti (Bernstein et al. 2007) e nella ridotta capacità angiogenetica delle cellule endoteliali (D'Alessio et al. 2004; Margheri et al. 2006), ci consente di ipotizzare che il blocco del clivaggio e della conseguente inattivazione di uPAR potrebbe rappresentare una promettente strategia per il trattamento della fibrosi e della vasculopatia periferica in corso di SSc.



## ***BIBLIOGRAFIA***

- Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9:S2.
- Aguirre Ghiso JA, et al. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signalling. *J Cell Biol.* 1999; 147:89-104.
- Akesson A, et al. Assessment of skin, joint, tendon and muscle involvement. *Clin Exp Rheum.* 2003; 21:5-8.
- Alexander RA, et al. VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution. *Cardiovasc Res.* 2012; 94:125-35.
- Andolfo A, et al. Metalloproteases cleave the urokinase-type plasminogen activator receptor in the D1-D2 linker region and expose epitopes not present in the intact soluble receptor. *Thromb Haemost.* 2002; 88:298-306.
- Andreasen PA, et al. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int J Cancer.* 1997; 72:1-22.
- Asahara T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85:221-8.
- Asano Y, et al. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 2010; 59:153-62.
- Avouac J, et al. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor  $\beta$ -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:1642-52.
- Avouac J, et al. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine.* 2013; 80:23-8.

- Balsara RD, et al. A deficiency of uPAR alters endothelial angiogenic function and cell morphology. *Vasc Cell*. 2011; 3:10.
- Baroni SS, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *New Engl J Med*. 2006; 354:2667-76.
- Batteux F, et al. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23:511-8.
- Beaufort N, et al. Proteolytic regulation of the urokinase receptor/CD87 on monocytic cells by neutrophil elastase and cathepsin G. *J Immunol*. 2004; 172:540-9.
- Behrendt N, et al. Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem*. 1996; 271:22885-94.
- Behrendt N, et al. The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*. 1991; 266:7842-7.
- Berman M, et al. Plasminogen activation (urokinase) causes vascularization of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1982; 22:191-9.
- Bernstein AM, et al. Urokinase receptor cleavage: a crucial step in fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Mol Bio Cell*. 2007; 18:2716-27.
- Beyer C, et al. Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11:220.
- Bhandary YP, et al. Regulation of alveolar epithelial cell apoptosis and pulmonary fibrosis by coordinate expression of components of the fibrinolytic system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 302:L463-73.
- Bhattacharya V, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. *Blood*. 2000; 95:581-85.

- Bhattacharyya S, et al. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 8:42-54.
- Black CM. Measurement of skin involvement in scleroderma. *J Rheumatol*. 1995; 22:1217-9.
- Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:932-43.
- Bohuslav J, et al. Urokinase plasminogen activator receptor,  $\beta$ 2-integrins and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med*. 1995; 181:1381-90.
- Bordron A, et al. The binding of some antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest*. 1998; 101:2029-35.
- Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh Migr*. 2012; 6:535-615.
- Cagnoni M, et al. La Sclerosi Sistemica e le sindromi correlate. Relazione al 95° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna. 1994 Ott 18-21 Firenze. Ed. Luigi Pozzi, Roma. 1995; 1-133.
- Carmeliet P, et al. Biological effects of disruption of the tissue-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 genes in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 748:367-81.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6:389-95.
- Carvalho D, et al. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. *J Clin Invest*. 1996; 97:111-9.

- Casale R, et al. Ultrastructural damages and dysfunction of postganglionic autonomic fibers in systemic sclerosis (SSc). *Ann Rheum Dis.* 2004; 61:335.
- Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 2005; 93:647-54.
- Chapman HA, et al. Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signalling. *Thromb Haemost.* 1999; 82:291-7.
- Chavakis T, et al. Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin- and urokinase receptor-dependent interactions. *Blood.* 2000; 96:514-22.
- Christner PJ, et al. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:1791-8.
- Cipriani P, et al. Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:1994-2004.
- Claman HN, et al. Chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma. II. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol.* 1985; 94:73-84.
- Clements PJ, et al. Inter and intra observer variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1995; 22:1281-5.
- Collen D, Lijnen HR. Thrombolytic agents. *Thromb Haemost.* 2005; 93:627-30.
- Comoglio PM, et al. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15:565-71.

- Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22:201-7.
- D'Alessio S, et al. Matrix metalloproteinase 12-dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:3275-85.
- Dees C, et al. Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med.* 2011; 208:961-72.
- Degryse B, et al. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signalling activity: generation of a new integrin inhibitor. *J Biol Chem.* 2005; 280:24792-803.
- Dellas C, Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost.* 2005; 93:631-40.
- Denton CP, et al. Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor leads to paradoxical activation of TGF-beta signaling pathways with fibrosis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2003; 278:25109-19.
- Dewerchin M, et al. Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1996; 97:870-8.
- Dickinson JL, et al. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. Evidence for an alternative biological function. *J Biol Chem.* 1995; 270:27894-904.
- Distler JH, et al. Endothelial progenitor cells: novel players in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2009; 60:3168-79.

- Distler O, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:2665-78.
- Distler O, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res.* 2004; 95:109-16.
- Drab M, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 2001; 293:2449-52.
- Duffield JS. The elusive source of myofibroblasts: problem solved? *Nat Med.* 2012; 18:1178-80.
- Falanga V. Localised scleroderma. *Med Clin North Am.* 1989; 73:1143-56.
- Fibbi G, et al. Interaction of urokinase A chain with receptor of human keratinocytes stimulates release of urokinase-like plasminogen activator. *Exp Cell Res.* 1990; 187:33-8.
- Fukao H, et al. Enhancement of tissue-type plasminogen activator (t-PA) activity by purified t-PA receptor expressed in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1356:111-20.
- Gabrielli A, et al. Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009; 360:1989-2003.
- Gentiletti J, et al. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol.* 2005; 175:2418-26.
- Giusti B, et al. The antiangiogenic tissue kallikrein pattern of endothelial cells in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:3618-28.

- Giusti B, et al. A model of anti-angiogenesis: differential transcriptome profiling of microvascular endothelial cells from diffuse systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8:R115.
- Gruschwitz K, et al. Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:184-9.
- Guiducci S, et al. Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun Rev.* 2007; 6:520-3.
- Gutierrez LS, et al. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.* 2000; 60:5839-47.
- Hashimoto K, et al. Skin pathology by light and electron microscopy. Igaku-Shoin, New York, Tokyo. 1983; 62-70.
- Herren T, et al. Regulation of plasminogen receptors. *Front Biosci.* 2003; 8:1-8.
- Heymans S, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med.* 1999; 5:1135-42.
- Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol.* 2003; 14:538-46.
- Hinz B, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012; 180:165-76.
- Hoyer-Hansen G, et al. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J Biol Chem.* 1992; 267:18224-9.



- Ishikawa H, et al. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:1688-95.
- Isogai Z, et al. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* 2003; 278:2750-7.
- Italiano JE Jr, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and anti-angiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008; 111:1227-33.
- Jaffee BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol.* 1983; 77:1-12.
- Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor  $\beta$ 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:2230-9.
- Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med.* 2004; 140:37-50.
- Kahaleh BM, et al. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Ann Intern Med.* 1981; 94:482-4.
- Kahaleh BM, et al. Elevated levels of circulating platelet aggregates and alpha-tromboglobulina in scleroderma. *Ann Int Med.* 1982; 96:610-3.
- Kahaleh MB, et al. Human monocyte modulation of endothelial cells and fibroblast growth: possible mechanism for fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986; 39:242-55.

- Kahaleh BM. Endothelin: an endothelial vasoconstrictor in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1991; 34:978-83.
- Kahaleh BM, et al. Endothelial injury and its implications. In: Neri Serneri GG, Gensini GF, Abbate R, Prisco D (eds). *Thrombosis: an update.* Scientific Press. Florence 1992; 649-61.
- Kahaleh BM, et al. Study of endothelial dependent relaxation in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1993; 36:233.
- Kahaleh BM et al. Assessment of vascular involvement. *Clin Exp Rheum.* 2003; 21:9-14.
- Kahaleh BM. Vascular involvement in systemic sclerosis (SSc). *Clin Exp Rheum.* 2004; 22:19-23.
- Kaminski MJ, et al. Lowered angiogenic capability of peripheral blood lymphocytes in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Invest Dermatol.* 1984; 82:239-43.
- Kanno Y, et al. The absence of uPAR is associated with the progression of dermal fibrosis. *J Invest Dermatol.* 2008; 128:2792-7.
- Kanse SM, et al. The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1996; 2254:344-53.
- Kikuki K, et al. Impaired growth response to endothelin-1 in scleroderma fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 207:829.
- Kircheimer JC, et al. Proliferation of human epidermal tumor cell line stimulated by urokinase. *FASEB J.* 1987; 1:125-8.
- Kitaba S, et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Phatol.* 2012; 180:165-76.

- Kiyani J, et al. Urokinase-induced signalling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR- $\beta$ . *EMBO J*. 2005; 24:1787-97.
- Koch AE, et al. Decreased monocyte-mediated angiogenesis in scleroderma. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992; 64:153-60.
- Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9:S3.
- Kuiper J, et al. Characterization of the interaction *in vivo* of tissue-type plasminogen activator with liver cells. *J Biol Chem*. 1988; 263:18220-4.
- Lau CS, et al. Further evidence of increased polymorphonuclear cell activity in the skin of normal human subjects and of patients with scleroderma. *Br J Rheumatol*. 1992; 31:375-80.
- Le Hir M, et al. A syndrome resembling human systemic sclerosis (scleroderma) in MRL/lpr mice lacking interferon-gamma (IFN-gamma) receptor (MRL/lprgammaR<sup>-/-</sup>). *Clin Exp Immunol*. 1999; 115:281-7.
- Leask A, et al. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2002; 4:136-42.
- Leask A. The role of endothelin-1 signaling in the fibrosis observed in systemic sclerosis. *Pharmacol Res*. 2011; 63:502-3.
- LeRoy EC, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988; 15:202-5.
- LeRoy EC. A brief overview of the pathogenesis of scleroderma. *Ann Rheum Dis*. 1992; 51:286-88.
- LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am*. 1996; 22:675-94.

- Liu D, et al. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for *in vivo* growth of a human carcinoma. *Cancer Cell*. 2002; 1:445-57.
- Llinas P, et al. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J*. 2005; 24:1655-63.
- Mackiewicz Z, et al. Increased but imbalanced expression of VEGF and its receptors has no positive effect on angiogenesis in systemic sclerosis skin. *Clin Exp Rheumatol*. 2002; 20:641-6.
- Majewski S, et al. Modulatory effect of sera from scleroderma patients on lymphocyte-induced angiogenesis. *Arthritis Rheum*. 1985; 28:1133-9.
- Manetti M, et al. Severe fibrosis and increased expression of fibrogenic cytokines in the gastric wall of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum*. 2007; 56:3442-47.
- Manetti M, et al. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mod Med*. 2010a; 14:1241-54.
- Manetti M, et al. Animal models of scleroderma: from cellular and molecular mechanisms to novel antifibrotic strategies. In: Abraham D, Handler C, Dashwood M, Coghlan G, eds. *Advances in vascular medicine*. London: Springer-Verlag. 2010b; 57-75.
- Manetti M, et al. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res*. 2011a; 109:14-26.
- Manetti M, et al. The origin of the myofibroblast in fibroproliferative vasculopathy: does the endothelial cell steer the pathophysiology of systemic sclerosis? *Arthritis Rheum*. 2011b; 63:2164-67.

- Manetti M, et al. A genetic variation located in the promoter region of the uPAR (CD87) gene is associated with the vascular complications of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011c; 63:247-56.
- Manetti M, Beyer C. The pathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. EULAR textbook on systemic sclerosis. BMJ Publishing Group. 2013; 68-76.
- Manetti M, et al. Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *J Cell Mol Med.* 2013; 17:482-96.
- Margheri F, et al. Domain 1 of the urokinase-type plasminogen activator receptor is required for its morphologic and functional  $\beta$ 2 integrin mediated connection with actin cytoskeleton in human microvascular endothelial cells: failure of association in systemic sclerosis endothelial cells. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:3926-38.
- Margheri F, et al. Modulation of the angiogenic phenotype of normal and systemic sclerosis endothelial cells by gain-loss of function of pentraxin 3 and matrix metalloproteinase 12. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:2488-98.
- Matucci Cerinic M, et al. From Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis (scleroderma): lack or exhaustion of adaptation. *Ad Organ Biol.* 1998; 6:241-53.
- Maurer B, et al. Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation.* 2009; 120:2367-76.
- Montuori N, et al. Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? *Thromb Haemost.* 2005; 93:192-8.
- Montuori N, et al. uPAR regulates pericellular proteolysis through a mechanism involving integrins and fMLF-receptors. *Thromb Haemost.* 2013; 109:309-18.

- Mulligan-Kehoe MJ, et al. Antiangiogenic plasma activity in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:3448-58.
- Nusrat AR, Chapman HA Jr. An autocrine role for urokinase in phorbol ester-mediated differentiation of myeloid cell lines. *J Clin Invest.* 1991; 1091-7.
- O'Reilly MS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997; 88:277-85.
- Okano Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996; 22:709.
- Ong VH, Denton CP. Innovative therapies for systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010; 22:264-72.
- Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signalling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12:613-20.
- Pablos JL, et al. The tight skin mouse: an animal model of systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22:81-5.
- Pignone A, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis: significant association with vascular involvement and alveolo capillary impairment. *Clin Exp Rheum.* 1998; 16:527-32.
- Ploug M, et al. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem.* 1991; 266:1926-33.
- Pluskota E, et al. Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration. *Blood.* 2003; 101:1582-90.

- Polakowski IJ, et al. Modulatory effect of sera from scleroderma patients on lymphocyte-induced angiogenesis: II. Effector cells for the enhancing effect of acroscleroderma patients' sera. *Arch Dermatol Res.* 1988; 280:395-8.
- Postlethwaite AE, Chiang TM. Platelet contributions to the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007; 19:574-9.
- Prager GW, et al. Urokinase mediates endothelial cell survival via induction of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Blood.* 2009; 113:1383-90.
- Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001; 10:393-415.
- Ragno P. The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63:1028-37.
- Ranson M, Andronicos NM. Plasminogen binding and cancer: promises and pitfalls. *Front Biosci.* 2003; 8:294-304.
- Reilly IAG, et al. Biosynthesis of thromboxane in patients with systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *Br Med J.* 1986; 292:1037-9.
- Resnati M, et al. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.* 1996; 15:1572-82.
- Ribatti D, Crivellato E. Immune cells and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2009; 13:2822-33.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386:671-74.
- Rothfield N. Autoantibodies in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992; 18:709.
- Roumm AD, et al. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis: quantification, subtyping and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 1984; 27:645-55.

- Ruzek MC, et al. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1319-31.
- Sambo P, et al. Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J Invest Dermatol.* 1999; 112:78-84.
- Samuel CS, et al. The relaxin gene knockout mouse: a model of progressive scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2005; 125:692-9.
- Santiago B, et al. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:1667-76.
- Seibold JR. Clinical trials: Types, design, and end-point. *Curr Opin Rheumatol.* 2001; 13:512-5.
- Serrati S, et al. Systemic sclerosis fibroblasts inhibit in vitro angiogenesis by MMP-12-dependent cleavage of the endothelial cell urokinase receptor. *J Pathol.* 2006; 210:240-8.
- Servettaz A, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase I induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol.* 2009; 182:5855-64.
- Sgonc R, et al. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest.* 1996; 98: 785-92.
- Sgonc R. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 120:169-76.
- Sidenius N, Blasi F. Domain 1 of the urokinase receptor (uPAR) is required for uPAR-mediated cell binding to vitronectin. *FEBS Lett.* 2000; 470:40-6.



- Simon DI, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) and the urokinase receptor (CD87) form a functional unit on monocytic cells. *Blood*. 1996; 88:3185-94.
- Simon DI, et al. Identification of a urokinase receptor-integrin interaction site. Promiscuous regulator of integrin function. *J Biol Chem*. 2000; 275:10228-34.
- Siracusa LD, et al. A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res*. 1996; 6:300-13.
- Sitrin RG, et al. The urokinase receptor (CD87) facilitates CD11b/CD18-mediated adhesion of human monocytes. *J Clin Invest*. 1996; 97:1942-51.
- Solanilla A, et al. The transport of high amounts of vascular endothelial growth factor by blood platelets underlines their potential contribution in systemic sclerosis angiogenesis. *Rheumatology*. 2009; 48:1036-44.
- Sonnylal S, et al. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2007; 56:334-44.
- Steen V, Medsger TA Jr. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1990; 16:1-10.
- Stummvoll GH, et al. Derangement of apoptosis related lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2000; 39:1341-50.
- Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980; 23:581-90.
- Sulli A, et al. La videocapillaroscopia periungueale nella sclerosi sistemica: parametri diagnostici e di follow-up della malattia e correlazione con il tipo di impegno cutaneo e con gli autoanticorpi specifici. *Reumatismo*. 2004; 56:34-45.

- Sulli A, et al. Scoring the nailfold microvascular changes during the capillaroscopic analysis in systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67:885-7.
- Tan FK, et al. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with scleroderma and other connective tissue diseases. *J Immunol.* 1999; 163:1066-72.
- Tarui T, et al. Critical role of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signalling. *J Biol Chem.* 2003; 278:29863-72.
- Tyndall AJ, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:1809-15.
- Uhrin P, Breuss JM. uPAR: a modulator of VEGF-induced angiogenesis. *Cell Adh Migr.* 2013; 7:23-6.
- van de Water J, Gershwin ME. Animal model of human disease. Avian scleroderma. An inherited fibrotic disease of white Leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis. *Am J Pathol.* 1985; 120:478-82.
- van der Pluijm G, et al. Urokinase-receptor/integrin complexes are functionally involved in adhesion and progression of human breast cancer *in vivo*. *Am J Pathol.* 2001; 159:971-82.
- Varga J and Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007; 117:557-67.
- Varga J, Withfield ML. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis (scleroderma). *Front Biosci.* (Schol Ed). 2009; 1:226-35.
- Vassalli JD, et al. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol.* 1985; 100:86-92.

- Verrall S, Seeds NW. Characterization of 125I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *J Cell Biol.* 1989; 109:265-71.
- Vettori S, et al. Role of microRNAs in fibrosis. *Open Rheumatol J.* 2012; 6:130-39.
- Wallis DD, et al. Abnormalities in fibrillin 1-containing microfibrils in dermal fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 2001; 44:1855-64.
- Wang L, et al. Degradation of internalized  $\alpha\beta 5$  integrin is controlled by uPAR bound uPA: effect on  $\beta 1$  integrin activity and  $\alpha$ -SMA stress fiber assembly. *PlosOne.* 2012; 7:33915.
- Wang Y, Kahaleh B. Epigenetic repression of bone morphogenetic protein receptor II expression in scleroderma. *J Cell Mol Med.* 2013; 17:1291-9.
- Wei Y, et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.* 1996; 273:1551-5.
- Wei Y, et al. Urokinase receptors promote  $\beta 1$  integrin function through interactions with integrin  $\alpha 3\beta 1$ . *Mol Biol Cell.* 2001; 12:2975-86.
- White B. Immune abnormalities in systemic sclerosis. *Clin Dermatol.* 1994; 12:349-60.
- White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996; 22:695-708.
- Wilhelm OG, et al. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J Cell Physiol.* 1999; 180:225-35.

- Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 93:440-7.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008; 208:1339-50.
- Xue W, et al. Physical association of complement receptor type 3 and urokinase-type plasminogen activator receptor in neutrophil membranes. *J Immunol.* 1994; 152:4630-40.
- Xue W, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components. *Cancer Res.* 1997; 57:1682-9.
- Yamamoto T, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1999; 112:456-62.
- Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol.* 2005; 14:81-95.
- Yamamoto T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res.* 2006; 297:333-44.
- Yoshizaki A, et al. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum.* 2011; 63:3575-85.
- Zhang F, et al. Distinct ligand binding sites in integrin  $\alpha 3\beta 1$  regulate matrix adhesion and cell-cell contact. *J Cell Biol.* 2003a; 163:177-88.

- Zhang G, et al. Urokinase receptor deficiency accelerates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003b; 14:1254-71.

Giunta al termine di questo importante percorso, colgo l'occasione per porgere i miei più sentiti ringraziamenti a tutti coloro che, con il loro aiuto materiale e morale, mi hanno accompagnato durante questi tre anni di Dottorato e mi hanno permesso di crescere, sia da un punto di vista lavorativo che personale.

Grazie di cuore alla Prof.ssa Lidia Ibba-Manneschi, al Dott. Mirko Manetti e alla Dott.ssa Annafranca Milia, che mi hanno accolto nel loro laboratorio e mi hanno seguito con pazienza e dedizione. Senza il loro supporto e la loro guida non sarei mai stata in grado di raggiungere questo traguardo.

Grazie alla Divisione di Reumatologia del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università degli Studi di Firenze, che ci ha gentilmente fornito i campioni umani da analizzare, e al Professor Peter Carmeliet, per averci donato i "capostipiti" della colonia di topi utilizzati per la ricerca.

Grazie a tutti i colleghi del Dipartimento, che in realtà sono stati per me più degli amici che dei semplici compagni di lavoro. Li ringrazio di cuore per avermi sempre incoraggiato e per essermi stati vicini nei momenti più difficili. Non dimenticherò mai le nostre "pause the" delle cinque e le scorpacciate di cioccolata!

Grazie a Leonardo, la persona più buona e semplice che abbia mai conosciuto. Mi hai cambiato la vita, mi sei sempre stato vicino e avrai sempre un posto speciale nel mio cuore..

Un ringraziamento speciale va infine alla mia famiglia, che ha sempre creduto in me e che mi ha appoggiato, anche quando credevo di non farcela. L'aiuto e l'incrollabile sostegno che mi hanno dato sono stati indispensabili: spero in futuro di continuare ad essere per tutti loro motivo di orgoglio e soddisfazione. Un pensiero particolare ai miei meravigliosi nipotini Sofia e Lapo: è bello giocare con voi a fine giornata, fa dimenticare ogni pensiero e preoccupazione.