



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E ODONTOIATRIA

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

**MECCANISMI IMMUNOLOGICI SU BASE
GENETICA DELL'ALOPECIA AREATA**

RELATORE

CHIAR.MO PROF. ALFREDO ROSSI

LAUREANDA

MARTINA GERARDI

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

*A mia madre e mio padre,
che mi hanno dato l' amore e l' allegria.*

*A mia sorella,
la migliore compagna di viaggio che potessi desiderare.*

"Curate. Se non potete curare, lenite.

Se non potete lenire, confortate"

A. Murri

INDICE

1. Cenni storici	Pag. 1
2. Introduzione	3
3. Clinica	6
4. Diagnosi	13
5. Ipotesi eziopatogenetiche	17
- Infezioni	17
- Atopia	19
- Fattori psicologici	19
- Citochine	24
- Patologie autoimmuni	25
- Anomalie dei melanociti e dei cheratinociti	27
- Fattori neurologici	28
- Teoria ormonale	29
- Teoria vascolare	29
- Teoria immunitaria	30
6. Ipotesi patogenetica	34
7. Aspetti anatomopatologici	37
8. Il privilegio immunologico	41
9. Alterazioni del privilegio immunologico	99
10. Le basi genetiche dell' alopecia areata	111
11. Iconografia	159
12. Bibliografia	164

CENNI STORICI

La prima descrizione dell' alopecia areata risale ai papiri medici di Tebe, città dell'antico Egitto, nel 1550 a.C., nei quali vengono descritte malattie della pelle identificabili con sufficiente attendibilità e fra queste si descrive già l'alopecia areata. Il primo ad adoperare il termine di "alopecia" fu Ippocrate, al quale si deve peraltro gran parte della terminologia medica e dermatologica tuttora adottata. Cornelio Celso medico romano del nel I sec. d.C e conoscitore dell' opera di Ippocrate descrisse l'alopecia areata e, in particolare, la varietà ofiasica, nel suo trattato il "De Re Medica". Celso parla di due forme di alopecia. La prima come di una completa calvizie, che capita in persone di tutte l'età, la seconda, più frequente nei bambini, era stata chiamata "serpente" perché il modo in cui l'area priva di capelli si sviluppava sulla pelle era serpeggiante. La mancata conoscenza dell' opera di Celso durante tutta l' epoca medievale segnò un arresto della conoscenza medica e anche di questa patologia. Bisognerà arrivare al Rinascimento per ritrovare le tracce di questa malattia, quando Nicolò V, papa dal 1471 al 1484, riscoprì e divulgò l'opera di Celso. In questi anni un dermatologo ferrarese, il Mainardi, cultore delle malattie del cuoio capelluto tese a sottolineare la differenza tra l'alopecia areata e l'alopecia "volgare" (alopecia androgenetica) quest'ultima provocata, secondo l'autore, da "scarsità di umori". Marcello Malpighi, nel 1600 , fu il primo a studiare in maniera più attenta la cute grazie alla scoperta del microscopio. Con l' avanzare delle tecniche gli studiosi del tempo attribuirono erroneamente la comparsa dell'alopecia areata a un fungo, il Pityrosporon, che poi si rivelò l'agente causale della pitiriasi versicolor e di altre patologie dermatologiche. L'Alibert, nel descrivere

l'area Celsi, paragonò il cuoio capelluto a terreni sterili, simili alle lande dove non può crescere nulla come conseguenza di qualche anomalia linfatica o nutrizionale. Si deve comunque a Beteman, nel 1820, il vero inquadramento clinico della malattia. Nel 1900 si provò definitivamente la natura non infettiva dell'alopecia areata e in trattati di dermatologia degli anni '40 e '50 si fa riferimento, in termini di patogenesi, ad un ipotetico spasmo dei vasi sanguigni nelle zone colpite dalla perdita di capelli associato a fattori quali disfunzioni tiroidee, ipofisarie, delle ghiandole genitali, del timo. Secondo un illustre dermatologo dell'epoca i casi più gravi potevano essere la risultante di una pregressa sifilide congenita. Il primo però a ipotizzare che la patogenesi della malattia fosse su base autoimmune fu Rothman nel 1958. Da un punto di vista classificativo la patologia venne chiamata dapprima "area Celsi" ma venne definita alopecia areata soltanto da Sauvages nel diciottesimo secolo.

1. INTRODUZIONE

Il termine “alopecia” deriva dal greco “ἀλώπιξ” che significa volpe, animale soggetto alla cosiddetta muta del pelo: un evento biologico fisiologico che avviene nei cambi di stagione. L’alopecia è, infatti, una condizione caratterizzata da una riduzione quantitativa dei peli in una regione del corpo normalmente dotata la cui frequenza varia dal 2% all’8%. Questa patologia, pur non mettendo a repentaglio la vita del paziente, può avere gravi ripercussioni sul suo equilibrio psichico condizionandone la vita di relazione. Le alopecie vengono classificate in congenite (ulteriormente suddivise in permanenti e transitorie) e acquisite, queste ultime suddivise in due grandi categorie: cicatriziali e non cicatriziali, da cui dipende anche l’andamento prognostico della malattia. Infatti, quelle non cicatriziali sono reversibili, a differenza di quelle cicatriziali la cui irreversibilità è legata alla distruzione del bulge che è la sede delle cellule staminali del follicolo, il cui ruolo è quindi quello di ricostituire l’integrità (78). Nella presente tesi ci occuperemo dell’alopecia areata che rappresenta una delle forme più comuni di alopecia non cicatriziale, la cui incidenza oscilla dal 2% al 2,5% della patologia dermatologica e la sua prevalenza è dello 0,1-0,2% con un lifetime risk del 2%. Non ha predilezione di sesso ed insorge sia negli adulti che nei bambini e in ogni tipo di capello. È estremamente rara nei bambini di età inferiore ai 3 anni e, in generale, i pazienti colpiti sono di età compresa tra i 20 e i 40 anni circa: il 66% hanno un’età inferiore ai 30 anni e il 20% dei pazienti supera i 40 anni. Raramente si manifesta dopo i 60 anni e nella razza nera. Questa patologia è associata con un aumentato rischio di sviluppare altre malattie autoimmuni (1,2) come accade nel 16% dei pazienti. Le patologie che più frequentemente si sviluppano in questi pazienti sono: il lupus erythematosus (0,6%

dei casi), vitiligine (4% dei casi), patologie tiroidee autoimmunitarie (dall' 8 al 28% dei casi) ed altre patologie per cui non è stata specificata la percentuale come ad esempio l' anemia perniciosa o la psoriasi. In relazione allo sviluppo di diabete mellito di tipo I Wang e collaboratori hanno dimostrato nel 1994 (3) come questo non sia molto frequente nei pazienti affetti da alopecia ma sia molto più frequente nei loro parenti. Numerosi studi condotti in pazienti affetti da atopica o da patologie autoimmuni hanno dimostrato, che queste malattie sono fattori di rischio per lo sviluppo di alopecia areata senza però specificare il rapporto temporale della loro insorgenza. Tra le malattie atopiche vanno incluse l' asma, la dermatite atopica, la febbre da fieno ed esse sono state riportate in una percentuale di pazienti che va dal 10% al 60% dei pazienti affetti da alopecia areata. L' associazione di queste patologie con l' alopecia areata mostra come alla base del meccanismo patogenetico ci sia il coinvolgimento sia delle cellule linfocitarie T CD4+ che delle cellule T CD8+ e a dimostrarlo sono le stesse patologie correlate all' alopecia. L' associazione dell' alopecia areata (4) con un' alta prevalenza di patologie mediate da una risposta delle cellule T di tipo CD4+, come ad esempio la psoriasi che è collegata con i Th1 o la dermatite atopica e il lupus eritematoso determinate da Th1 e Th2, e la presenza di malattie determinate da un meccanismo di tipo CD8+, come la vitiligine, sono un'ulteriore conferma dei meccanismi patogenetici di tipo immunologico alla base dell' alopecia areata. Gli esatti meccanismi patogenetici, le loro modalità e tempistiche di attivazione in relazione a questa malattia rimangono ancora sconosciuti anche se, negli anni, sono state proposte varie ipotesi tra cui quella più accreditata sembra essere riconducibile a una patogenesi autoimmune. Il processo immunitario che conduce alle manifestazioni cliniche di alopecia è

collegato alla perdita del privilegio immunologico del follicolo pilifero in anagen. La frequente associazione con altre affezioni, i reperti variabili bioumorali riscontrati nei diversi casi e l'evoluzione imprevedibile, in quanto caratterizzata da remissione e recidive , ne fanno un'entità unica ed eterogenea e la rendono una patologia estremamente interessante da studiare ed approfondire.

2. CLINICA

L'inquadramento clinico dell'alopecia areata non è sempre agevole in quanto si può manifestare in maniera variabile da paziente a paziente e l'andamento non è sempre prevedibile (5). Di solito esordisce con la comparsa improvvisa di una chiazza singola o chiazze multiple totalmente prive di peli, di forma circolare o ovalare, di diametro variabile da 1 a 3 cm, a margini definiti. Nonostante la perdita di capelli sia nella maggior parte dei casi asintomatica, alcuni pazienti riferiscono bruciore, prurito, talvolta manifestazioni di tipo nevralgico e parestesie prima della comparsa della chiazza, sintomi questi aspecifici e difficilmente riferibili, in prima istanza, a questa patologia. Talvolta si assiste alla comparsa di un modesto rossore con edema che rientrano tra le espressioni cliniche della flogosi alla base malattia. Nelle fasi iniziali di ricrescita i capelli sono spesso depigmentati (6). Da qui l'ipotesi di un coinvolgimento dei melanociti e dei meccanismi di formazione della melanina. La cute, spesso pastosa alla palpazione, appare liscia, aflegmasica, di colorito bianco latte con note finemente grigiastre e traslucide. Gli sbocchi follicolari appaiono dilatati. Le chiazze si localizzano più frequentemente a livello del cuoio capelluto in sede parietale e temporo-occipitale, ma possono interessare la barba e qualsiasi area del corpo. Possono rimanere stabili per molto tempo o risolversi spontaneamente. Altre volte, invece, vanno incontro a una nuova ripresa evolutiva con un'estensione tipicamente centrifuga. Comunque, nella maggior parte dei casi, l'alopecia evolve favorevolmente con la ricrescita di peli "folletto" non pigmentati

che si trasformano poi in peli di tipo terminale normopigmentati a seguito di numerosi cicli abortivi.

I segni clinici più importanti, di attività della malattia, sono rappresentati dai peli a punto esclamativo e dai peli "cadaverizzati"(7). I primi sono peli corti, tronchi, a 3 mm dall'ostio follicolare, con diametro e colore che si riducono progressivamente in senso prossimale; derivano da un'alterazione transitoria del processo di cheratinizzazione del follicolo (8, 9). Si è ipotizzato un improvviso blocco delle mitosi dei cheratinociti pilari e della successiva differenziazione delle cellule corticali, processi questi che porterebbero alla fragilità del fusto e a una rapida riduzione del suo diametro in senso prossimale fino a un bulbo in telogen completamente distrofico (10). Tale processo, a volte, può essere però interrotto da una ripresa delle attività follicolari dando origine clinicamente a fusti con aspetto moniliforme (pseudo monilitrix).

I peli "cadaverizzati", invece, che si riscontrano spesso nelle forme grave di alopecia, appaiono come punti neri in corrispondenza della superficie cutanea. Non superano, di solito, l'ostio follicolare e la morfologia del fusto è completamente sovvertita. Sono facilmente estraibili senza provocare dolore e microscopicamente risultano iperpigmentati. Queste formazioni derivano dall'accumulo di cheratina negli infundibuli dilatati dei follicoli piliferi in anagen (11).

La classificazione clinica dell'alopecia areata identifica quattro varianti che si differenziano in base alla pattern di caduta dei capelli:

- A.A. PROPRIAMENTE DETTA : chiazze singole o multiple che possono interessare il capillizio e/o la barba. Questa forma è caratterizzata dalla presenza di aree glabre, di numero ed estensione variabili. (Fig1; Fig.2)

- FORMA OFIASICA : interessa le regioni temporo-occipitali, presenta un decorso serpiginoso con possibile estensione all'intero cuoio capelluto. È correlata ad una prognosi peggiore, colpisce soprattutto pazienti in età pediatrica, spesso in associazione con atopia e col nevo flammeo nucale . Tale quadro risulta poco responsivo alla terapia. Nell'ofiasi invertita la localizzazione è a livello fronto-parieto-temporale. (Fig.3)

- FORMA TOTALE: interessa l'intero cuoio capelluto.

- FORMA UNIVERSALE: caratterizzata dalla scomparsa di tutti i capelli e dell'intero manto pilare. (Fig.4)

Altre forme poco frequenti sono quella "RETICOLARE" (caratterizzata dalla contemporanea presenza di chiazze in fase attiva e di altre in regressione) (Fig.5), la forma DIFFUSA o INCOGNITA (pattern di diradamento annessiale non in chiazze ma diffuso, a tipo telogen effluvium) (Fig.6), la forma PERINEVOIDE (chiazza alopecica attorno a un nevo melanocitico).

Accanto a questa classificazione alcuni autori considerano valida, soprattutto da un punto di vista prognostico, la classificazione di Ikeda, formulata nel 1965 che prevede quattro tipi di alopecia:

- TIPO COMUNE: molto frequente (83 %) e con una prognosi generalmente buona. Solo il 6 % dei pazienti, infatti, va incontro ad alopecia totale . Compare nella

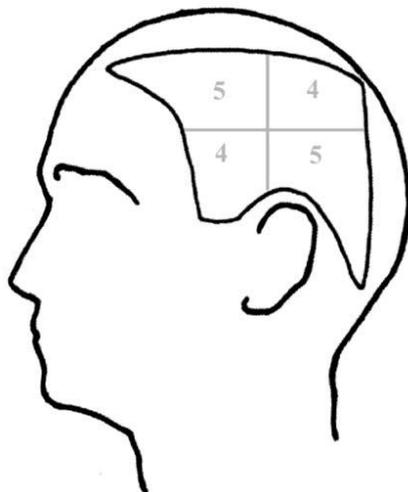
tarda adolescenza o nei primi anni della vita adulta, ha un decorso inferiore ai 3 anni, regredisce in meno di 6 mesi e non è associata ad altre patologie autoimmuni.

- TIPO ATOPICO (10%): la prognosi, in questi casi, è sfavorevole. Il 75% dei pazienti va incontro ad alopecia universale. Si manifesta quasi sempre nell'infanzia associata a diatesi atopica. Il decorso è prolungato.

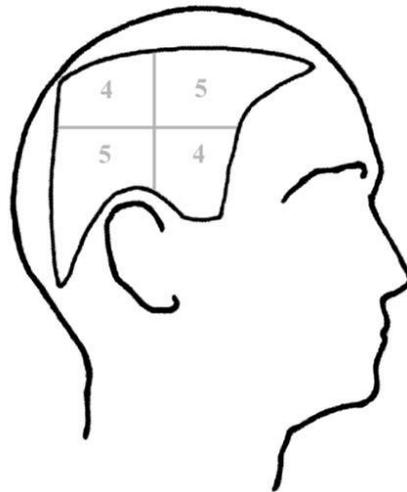
- TIPO PREIPERTENSIVO (4%) : colpisce giovani e adulti con diatesi ipertensiva. Evolve rapidamente verso un alopecia totale.

- TIPO AUTOIMMUNE (3%): associata ad affezioni endocrine su base autoimmune come il diabete di tipo I, la tiroidite linfocitaria. L'esordio è al di sopra dei 40 anni e ha un decorso persistente.

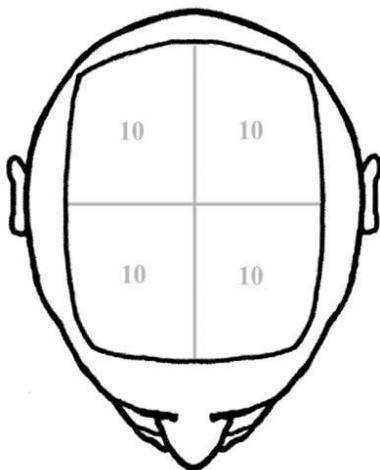
Di notevole utilità si è rivelato il diagramma, qui sotto riportato, ideato da Olsen & Canfield



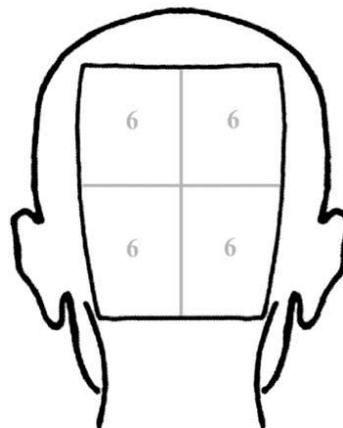
LEFT SIDE: 18%



RIGHT SIDE: 18%



TOP: 40%



BACK: 24%

Olsen/Canfield

Questo diagramma permette di stimare la percentuale di perdita di capelli attraverso una suddivisione della testa in quattro quadranti(destro, sinistro, superiore, posteriore)a loro volta suddivisi in altri quattro quadranti più piccoli. All'area destra e sinistra del capo corrisponde il 18 %, alla regione superiore il 40 % e alla regione posteriore il 24 %. Sommando la percentuale numerica di perdita di

capelli relativa a ciascun quadrante si ottiene così la percentuale totale di perdita di capelli.

È importante inoltre sottolineare come l'alopecia areata sia spesso associata ad altre alterazioni a livello dei vari organi e apparati. È possibile osservare frequentemente modificazioni eterogenee della lamina ungueale, soprattutto di tipo distrofico, la cui incidenza varia dal 7% al 66%. La gravità di queste manifestazioni non coincide però con la gravità dell'alopecia. Tra le anomalie più frequenti a livello della porzione prossimale della matrice si riscontrano il pitting (depressioni cupoliformi) (Fig.7), l'onicomadesi (Fig.9.a), le linee di Beau (Fig.9.b), la leuconichia puntata (Fig. 9.c), e la mazzatura della lunula sono invece l'espressione clinica di un danno a livello della matrice distale. Nel 3% dei casi si può manifestare una grave onicodistrofia coinvolgente tutte e 20 le unghie definita trachionichia o "twenty nail dystrophy" (Fig. 8) in cui la lamina ungueale ha un aspetto simile a una superficie trattata con carta vetrata. Tale quadro clinico è più frequente nei bambini e può sia precedere che seguire, anche di anni, l'alopecia areata.

Altre alterazioni che possono associarsi all'alopecia areata sono a carico dell'occhio e comprendono opacità punctate del cristallino o anomalie morfologiche e funzionali dell'epitelio pigmentato retinico con degenerazione microcistica (12). Frequenti sono anche l'atrofia dell'iride, l'ectopia pupillare, displasie dei vasi retinici la cui specificità non è tuttavia completamente dimostrata (13). Tali reperti sono stati evidenziati soprattutto nell'alopecia totale e universale e possono rimanere

isolati o rientrare a far parte di una sindrome più complessa: la sindrome di Vogt-Koyanagi-Harada.

I soggetti affetti da questa sindrome presentano uveite, ipoacusia, alterazioni neurologiche, vitiligine e alopecia areata; tutte espressione di un interessamento polidistrettuale dei melanociti localizzati, infatti, non solo a livello epidermico e follicolare ma anche a livello dell'uvea, dell'orecchio interno e delle meningi

3. DIAGNOSI

Nonostante i reperti anatomopatologici siano importanti per definire in maniera accurata le caratteristiche della patologia e per fugare ogni eventuale dubbio circa la natura di questa, soltanto uno studio clinico accurato consente di porre diagnosi di alopecia areata.

L'anamnesi, considerata "madre di tutte le diagnosi", è il primo step da seguire per inquadrare la malattia. È essenziale valutare la storia familiare del paziente e in particolare se esiste una familiarità per patologie quali alopecia, tireopatie, allergopatie, affezioni gastrointestinali o patologie autoimmunitarie; la positività per almeno una di queste patologie può risultare diagnostica.

Si indagheranno poi le eventuali affezioni in atto o passate (comprese le terapie farmacologiche intraprese) e si prenderanno in considerazione tutti i possibili fattori scatenanti l'alopecia, compresi quelli psicologici. È di fondamentale importanza focalizzare poi l'attenzione sull'attuale patologia in atto e quindi sull'età e sulle modalità di comparsa delle chiazze, sulle caratteristiche obiettive e sintomatologiche riferite dal paziente (bruciore, prurito, talvolta manifestazioni di tipo nevralgico e parestesie prima della comparsa della chiazza) che le definiscono.

Bisogna, quindi, analizzare l'aspetto della cute e di come questa si presenta all'ispezione (presenza e quindi localizzazione e dimensioni delle chiazze, presenza e valutazione delle zone normali di cute, aspetto morfologico delle chiazze, presenza di edema e rossore, valutazione dei peli residui e/o dei peli in ricrescita, valutazione

degli sbocchi follicolari ed evidenza di peli cadavere e peli a punto esclamativo) e alla palpazione (cute pastosa, liscia, aflegmasica). Non bisogna tralasciare mai, inoltre, la conduzione di un appropriato esame obiettivo a carico delle unghie caratterizzate da alterazioni come pitting, le linee di Beau, l'onicomadesi, la leuconichia puntata e la marezatura della lunula o, come precedentemente detto, la trachionichia. L'imprevedibilità della malattia e le frequenti recidive sono tutti elementi che rientrano nel complesso quadro diagnostico.

Spesso un esame emocromocitometrico e il dosaggio di anticorpi specifici sarà di valido ausilio per comprendere meglio la situazione clinica del paziente, confermare le patologie in atto riferite dal paziente o diagnosticarne di nuove. Valori bassi di sideremia e ferritina potrebbero, ad esempio, mettere in evidenza un malassorbimento che è spesso indicativo di celiachia quindi, in questo caso, sarebbe opportuno dosare, ai fini della diagnosi sierologica di malattia celiaca, sia i livelli sierici totali di IgA che i livelli di IgA anti-endomisio e anti-transglutaminasi. In questa patologia la diagnosi sarà certa solo quando è supportata da un' esame biotico condotto sulla mucosa duodenale perché, come dimostrato, si associa in molti casi all'alopecia areata. È altrettanto importante valutare la funzione tiroidea attraverso il dosaggio degli ormoni tiroidei e la valutazione della presenza di tiroiditi autoimmuni con il dosaggio degli anticorpi anti-tiroidei sierici come gli anticorpi anti-tireoperossidasi e anti-tireoglobulina

Non rimane che effettuare una diagnosi differenziale con patologie sia di natura congenita che acquisita. Tra quelle congenite possiamo menzionare l'aplasia cutis, l'alopecia triangolare temporale, l'ipotricosi semplice o congenita ereditaria di

Marie-Unna, etc...Tra quelle acquisite l'alopecia androgenetica, l'anagen effluvium, il telogen effluvium, la tricotillomania, l'alopecia da cause infettive e l'alopecia cicatriziale sono tutte affezioni che possono avere elementi comuni o simili all'alopecia areata (46) (47).

Esistono inoltre patologie come il lupus eritematoso cronico cutaneo, il lichen plano-pilare, la follicolite decalvante che mostrano spesso un'alopecia cicatriziale con caratteristiche molto simili a quelle dell'alopecia areata per la presenza di chiazze prive di capelli. In questi casi, l'esame istologico diventa dirimente.

Nella tricotillomania la chiazza non è ben delimitata e i peli risultano spezzati a una distanza variabile dall'ostio follicolare. Nei soggetti affetti da alopecia androgenetica si riscontra una progressiva miniaturizzazione dei capelli valutabile sia clinicamente con il test del cartongelato che attraverso il tricogramma (pluck test). La perdita di capelli in questi casi non è marcata infatti il pull test è spesso negativo. In presenza di un pattern diffuso occorre escludere un eventuale telogen effluvium. In questi casi il tricogramma è di fondamentale ausilio diagnostico in quanto mette in evidenza la perdita di capelli in fase anagen o telogen distrofici. Ciò avviene nell'alopecia areata dove spesso si ha un quadro di tipo telodistrofico ai bordi della chiazza e distrofico in sede controlaterale. Nel telogen effluvium i capelli distrofici sono esclusivamente telogen.

Nei casi dubbi, soprattutto quelli caratterizzati da un pattern diffuso, è indispensabile il prelievo bioptico. All'esame istologico l'infiltrato peribulbare a "sciame d'api" e l'assenza di fibrosi consentono, quando naturalmente supportati da una evidenza clinica, di formulare diagnosi di alopecia areata.

Ad assumere però oggi un ruolo di primaria importanza per la diagnosi dell'alopecia areata è la videodermatoscopia. Si tratta di una metodica che oltre ad avere il vantaggio di non essere invasiva evidenzia in modo accurato quelli che sono i segni clinici alla base della malattia e che possono essere quindi considerati veri e propri pattern di riferimento: i peli cadaverizzati (punti neri sulla superficie cutanei), i peli a punto esclamativo, i caratteristici "yellow spots" che sono manifestazione dell'ipercheratosi e i grey spots. Dei peli cadaverizzati e a punto esclamativo abbiamo già parlato in precedenza mentre gli yellow spots derivano dall'infiammazione peripilare che sostiene la patologia e dall'ipersecrezione sebacea, infatti alla vitreoppressione è frequente la fuoriuscita di sebo. I grey spots corrispondono ad una fase di risoluzione del processo flogistico e, quindi, ad una fase di quiescenza della malattia.

5. IPOTESI EZIOPATOGENETICHE

I meccanismi eziopatogenetici responsabili della alopecia areata sono ancora in gran parte sconosciuti. L'orientamento attuale è comunque quello di non considerare esclusivamente un singolo fattore causale ma più fattori che, in concomitanza tra loro e in soggetti geneticamente predisposti, determinano la comparsa e il mantenimento della patologia. Condizioni quali infezioni, sia di natura batterica che virale, atopia, fattori genetici, fattori psico- neurologici, alterazioni ormonali, vascolari e della risposta immunitaria sembrano essere tutte implicate nello scatenamento e/o nel mantenimento di questo complesso quadro patologico.

- INFEZIONI

Sembra che l'alopecia areata possa essere provocata anche da infezioni. Le più antiche ricerche , di valore ormai esclusivamente storico, sono state rivolte all'identificazione di un singolo agente microbico causale. Oggi, i foci infettivi più frequenti, associati all'alopecia areata, sono localizzati a livello dentale (soprattutto granulomi apicali) e gengivale, a livello delle tonsille , dei seni paranasali, a livello dell'apparato urinario e ginecologico. Alcuni autori ritenevano, in passato, che la bonifica di queste infezioni potesse determinare un netto miglioramento della malattia ma studi più recenti non hanno evidenziato alcun segno di regressione. Un'affascinante ipotesi sarebbe quella per cui un virus, probabilmente della famiglia

degli Herpes virus, in soggetti geneticamente predisposti, penetrando nell'organismo e modificando alcune proteine cellulari simili a quelle del follicolo pilifero (forse cheratina o melanina) attiverebbe il sistema immunitario dell'ospite contro un bersaglio "innocente" come i peli e/o le unghie.

Nel '95 Skinner, attraverso la tecnica della PCR, aveva evidenziato una correlazione tra l'alopecia areata e il citomegalovirus . Attraverso uno studio sui topi si era visto che dopo iniezione sotto cute di CMV murino, trovato nelle papille del follicolo, i ratti sviluppavano l'alopecia areata. La latenza del CMV, legata alla sorveglianza immunitaria, spiegherebbe le remissioni intermittenti e le ricadute (14). Esperimenti compiuti nell'università di Bologna hanno sminuito il ruolo del CMV.

Sebbene tutt'oggi non sia stata provata l'origine virale dell'alopecia areata il possibile mimetismo molecolare tra antigeni virali e antigeni follicolari rimane un interessante oggetto di ricerca.

Uno studio del 2005 riporta casi di alopecia universale in soggetti con infezione disseminata da molluschi contagiosi e dermatite atopica che, dopo il trattamento con IFN γ , avevano riscontrato una significativa ricrescita dei capelli. Dibattuto resta il ruolo dell'H.Pylori che sembra essere associato anche all'alopecia areata oltre a vari tipi di dermatosi come l'orticaria, la rosacea, la dermatite atopica. L'eradicazione di questo non condurrebbe, tuttavia, a una risoluzione della patologia (15) .

Secondo recenti ricerche vi sarebbe un'associazione tra alopecia areata e malattie sessualmente trasmesse quali HIV e sifilide ma la correlazione con queste patologie resta ancora da approfondire (16)

- ATOPIA

Il soggetto atopico può essere definito un individuo “disreattivo”, che risponde in modo abnorme e imprevedibile agli stimoli di natura immunitaria. Numerosi studi dimostrano come il terreno atopico sia un importante fattore di rischio per l'alopecia areata. Nell'atopico l'alopecia areata ha di solito un'insorgenza più precoce, risulta più estesa e l'evoluzione verso la forma universale è molto probabile (17). Anche la durata della malattia sembra protrarsi maggiormente nel tempo. Da questi dati emerge come la prognosi nei pazienti affetti da entrambe le patologie sia più sfavorevole. Sono stati però osservati molti adulti atopici che per anni hanno presentato chiazze stabili o autorisolvendosi, quasi a considerare la forma lieve di alopecia come un “marker” dell'atopia. Alcuni studi hanno confrontato i livelli in vivo di IL-4, IL-10, TGF β e l'mRNA di INF γ , a livello delle cellule mononucleate del sangue periferico, nei pazienti con alopecia areata e nei pazienti affetti da dermatite atopica. In entrambi i gruppi di pazienti sono stati riscontrati ridotti livelli di INF γ e TGF- β 1. Questi dati evidenziano, quindi, una similarità tra le due patologie basata sul profilo citochinico (18).

- FATTORI PSICOLOGICI

Sebbene esistano pareri contrastanti circa il ruolo dei fattori emozionali nella patogenesi dell'alopecia areata in molti hanno evidenziato la comparsa della

malattia in stretta correlazione con uno stress più o meno acuto, un disagio mentale o uno shock emotivo. Non è chiaro però se questi eventi siano le cause o le conseguenze della malattia. Lo stress psicosociale è stato dimostrato avere un ruolo chiave nel provocare o esacerbare l'alopecia areata ed il trattamento della comorbilità depressiva potrebbe essere vantaggioso anche per la risoluzione dell'alopecia areata (21).

In uno studio effettuato dalle università londinese e canadese i pazienti trattati con Imipramina hanno riscontrato una significativa ricrescita dei capelli dopo circa sei mesi di terapia. Evidenze di un'origine psichica dell'area Celsi iniziano già nel secolo scorso. Studi psichiatrici sulla personalità del paziente alopecico rivelano le difficoltà psicologiche di questi soggetti come la mancanza di iniziativa e una sorta di inibizione affettiva, sessuale e sociale. Attraverso l'ausilio di test psicodiagnostici due studiosi, Panconesi e Mantellassi, evidenziarono stati nevrotici segni di "disreattività psichica" agli avvenimenti stressanti, causa di reazioni abnormi agli avvenimenti stessi.

L'alopecia areata potrebbe così derivare da "un'ansietà nevrotica" accumulata per lungo tempo e si configurerebbe come una modalità di reazione all'esperienza di perdita. Il Cavolini nel 1955 aveva già sottolineato il fortissimo attaccamento del malato alopecico alla madre e di questa verso di lui. Tale dipendenza sarebbe alla base di quella insicurezza e quelle ansie di fondo in genere combattute con grande sforzo per tenere nella vita comportamenti pseudoadulti che consentano di conservare l'approvazione dell'ambiente.

L' alopecia areata ha un ruolo importante nella qualità di vita del paziente. Questo indicatore, poco applicato fino a circa 20 anni fa nello studio delle patologie dermatologiche, è diventato progressivamente più importante nella gestione del paziente dermatologico per le numerose implicazioni sociali ed emozionali che le patologie cutanee e, in questo caso, del capillizio comportano. Gli indicatori sulla qualità della vita (QoL) sono questionari completati direttamente dal paziente e perciò devono essere semplici, facili da capire e rapidi da completare senza che il paziente sia supportato dalla supervisione medica. Al momento ci sono cinque questionari specifici che sono stati descritti per essere usati nella popolazione adulta: lo Skindex, il Dermatology Life Quality Index (DLQI), il Dermatology Quality of Life Scales (DQOLS), il Dermatology Specific Quality of Life (DSQL) e la scala di valutazione della Qualità di Vita Italiana in Dermatologia (QUAVIDERM). Sono tutt' ora in studio scale di valutazioni specifiche per pazienti affetti da alopecia areata che mirano ad elaborare nuovi modelli, come ad esempio l' AA-QLI, da proporre al paziente affinché esso possa avere una maggiore comprensione dei quesiti che gli vengono proposti. È fondamentale valutare tutti gli aspetti della vita psichica e di relazione di questi pazienti con particolare attenzione al loro modo di percepire i sintomi soggettivi e i segni obiettivi, la loro relazione con mezzi atti a "nascondere" o "coprire" la loro patologie (parrucche, bandane, cappelli) e il loro rapporto con la patologia. In relazione a questo ultimo punto i disagi che affliggono il paziente da un punto di vista emotivo sono moltissimi e, probabilmente, non del tutto classificabili, essi comprendono: il rifiuto della malattia, una distorta percezione della sua durata e delle implicazioni socio-economiche che essa potrebbe comportare, la preoccupazione che essa non regredisca, peggiori o possa essere trasmessa

geneticamente ai figli e la percezione di un rifiuto da parte della società. È proprio nelle relazioni che si incontrano i maggiori problemi per il paziente che mostra difficoltà ad intrattenere i rapporti già istituiti o ad instaurarne di nuovi: questo si ripercuote sia nei rapporti familiari, di amicizia e sessuali.

È fondamentale ricordare, sia per il medico che per il paziente, che l'intensità dell'effetto della patologia è molto variabile e non correla con la sua severità clinica; molte volte questo fattore è un motivo di incomprensione della percezione che il paziente o il medico hanno della patologia.

Le misurazioni usate per valutare la severità della malattia descrivono in modo insufficiente lo stato di affezione psicologica dei pazienti alopecici che, comunque, richiedono un'importante supporto psicologico per tutta la durata della terapia e della malattia. Queste sono necessarie al fine di favorire un maggiore adattamento alla "convivenza con la malattia" e potenziamento dell'autostima. La conoscenza della malattia, spiegata in modo idoneo da una figura medica preparata, la psicoterapia e gruppi di supporto possono essere di notevole aiuto per il paziente affetto da alopecia areata. È abbastanza utile, per il paziente, utilizzare tecniche di camouflage: supporti posticci come parrucche o toupees, ciglia e sopracciglia artificiali o tatuaggi permanenti o temporanei. Reid e altri hanno dimostrato come l'assenza di queste strategie terapeutiche possa contribuire ad una maggiore percezione negativa dell'immagine personale e della perdita dei capelli. Dall'altro lato se i medici sono in grado di assistere in modo opportuno i pazienti la loro condizione clinica può migliorare.

Queste conoscenze cliniche sono supportate da studi compiuti sul sistema neuro endocrino. Le attuali ricerche sull' alopecia areata hanno evidenziato come la sostanza P e il nerve growth factor (NGF) sono mediatori dell'inibizione della crescita dei capelli indotta dallo stress. Questi pazienti hanno inoltre un aumento dell' attività dell' asse ipotalamo-ipofisi-surrene che è coinvolto nella risposta allo stress causando incapacità di adattarsi ai diversi tipi di stress. Per questi motivi un management corretto dello stress può migliorare la malattia. Infatti sebbene gli eventi e le esperienze stressanti hanno un ruolo minore nell' esordio iniziale dell' alopecia, la depressione e l' ulteriore stress causato dalla malattia potrebbe, invece, affliggere, in modo negativo, il corso della malattia attraverso dei mediatori dello stress e vie psico-neuro-immunologiche.

È importantissima in questa patologia la relazione medico paziente che si ripercuote su i diversi aspetti del management della patologia che vanno dalla diagnosi alla terapia e quindi alla prognosi della patologia. È importante che il medico si metta in condizione di comprendere l'impatto della malattia sulla vita di relazione, sulla vita quotidiana e sui sentimenti più intimi del paziente e, a sua volta, faccia ben intendere al paziente che i suoi problemi clinico- psicologici sono conosciuti e compresi dal medico e pertanto possono essere affrontati.

- CITOCHINE

Le citochine sono proteine coinvolte nel processo infiammatorio che giocano un ruolo importante nei meccanismi immunologici alla base dell'alopecia areata. Vengono sintetizzate dai linfociti Th1, Th2 e dai cheratinociti epiteliali.

L' IL2 α , IL1 β , e il TNF α , derivanti dai cheratinociti epiteliali, sono dei potenti inibitori della crescita del follicolo pilifero, in grado di alterarne anche la morfologia come dimostrato dai numerosi esperimenti in vitro. Studi recenti hanno messo in evidenza come una diversa espressione citochinica influenzerebbe l'estensione della patologia. Livelli sierici di IL1 α e IL-4 sembrano essere più elevati nei pazienti affetti da forme di alopecia localizzate mentre quelli di IFN γ e IL-2 risulterebbero più rappresentati nei pazienti con alopecia areata universale (23). Sembrerebbe, inoltre, che l'alopecia areata, possa essere indotta da una aberrante espressione di IFN γ in individui le cui cellule mononucleate del sangue periferico producono basse quantità di IFN γ e TGF β 1 (19). Un ruolo importante verrebbe anche svolto dall'immunomodulatore AS-101 che, com'è noto, ha la funzione di inibire la produzione di IL-10, IL-2R e IL-5. Questa inibizione è stata riscontrata più marcata nei bambini con alopecia areata a chiazze, rispetto ai soggetti giovani sani (24)

Nuovi studi, effettuati nel 2006 dall'università di Tokio, hanno inoltre valutato i livelli sierici di alcune citochine nei pazienti affetti da alopecia areata quali IL-8, RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MIG (monokine induced by IFN γ), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein), MIP-1 β . I risultati hanno evidenziato un

aumento dei livelli sierici di RANTES, MIG, IL-8 nei pazienti affetti da alopecia areata rispetto ai casi controllo. RANTES gioca un ruolo importante nella chemiotassi delle cellule Th1 e partecipa, inoltre, alle risposte Th2 mediate. Può infatti aumentare selettivamente la produzione di IgE e risulta elevato anche nel siero di pazienti con dermatite atopica.

L'aumento nel siero di MIG e RANTES nell'alopecia areata non è comunque correlato né al tipo di alopecia né all'estensione delle lesioni. L'inibizione di queste citochine potrebbe quindi rappresentare una valida strategia terapeutica e il loro dosaggio un marker utile di attività della malattia (25). L'aumento sierico di questi fattori non è però predittivo della prognosi della malattia o del tipo di alopecia a cui potrebbe andare incontro il nostro paziente.

- PATOLOGIE AUTOIMMUNI

Le malattie autoimmuni che possono associarsi all'alopecia areata sono il diabete mellito di tipo I, la tiroidite di Hashimoto, la vitiligine, la gastrite cronica atrofica, il LES, l'artrite reumatoide, la miastenia gravis, la colite ulcerosa, la polimialgia reumatica, il morbo celiaco (26, 27).

Questa associazione è dimostrata dalla presenza di anticorpi in circolo come quelli antireoglobulina, antimicrosomiali e antiperossidasi. Questi possono risultare positivi anche in assenza di segni clinici evidenti di tireopatia. Spesso infatti i soggetti sono del tutto asintomatici e il reperto di positività anticorpale è del tutto

occasionale. Tale reperto è più frequente in donne giovani affette da alopecia severa, a insorgenza precoce. L'ipotesi di una tiroidite autoimmune subclinica è stata inoltre suggerita dalla presenza di un'infiltrato linfocitario in seno alla ghiandola, evidenziato da studi istologici(28).

L'associazione col morbo celiaco a seconda delle statistiche varia dal 10% al 15% e sembra essere confermata dalla positività sierica per anticorpi antigliadina IgA, IgG e antiendomio. Questi ultimi sembrano essere diretti contro l'enzima TRANSGLUTAMINASI (tTG) (29). Nella patogenesi del morbo celiaco è stato infatti ipotizzato un meccanismo di tipo immunitario sia umorale che cellulare contro tali sostanze a livello della parete intestinale. La celiachia, che consiste in una intolleranza al glutine e che provoca un progressivo malassorbimento con appiattimento dei villi intestinali, nei pazienti con alopecia areata si può manifestare anche con sintomi minori quali anoressia, astenia, nausea, vomito, dolori addominali, anemia sideropenica più o meno marcata.

Spesso a questi si aggiungono alterazioni del sistema pilifero quali incanutimento precoce, capelli sottili, barba rada, caduta dei peli ascellari. In alcuni casi il morbo celiaco può avere come unico segno clinico l'alopecia areata a dimostrazione della disreattività immunologica del soggetto. In alcuni casi è necessario effettuare una EGDS con prelievi biotici multipli e l'esame istologico per arrivare a definire la diagnosi. Anche il diabete mellito di tipo I si è dimostrato frequentemente associato all'alopecia areata. Ciò è stato confermato da studi che hanno evidenziato come una storia di diabete mellito sia molto più comune in membri familiari di bambini con alopecia areata (18,4%) rispetto a casi controllo (2%) (30). Nei soggetti affetti da

diabete mellito tipo I e alopecia areata l'esame istologico mostra un infiltrato linfocitario a livello dei bulbi piliferi e autoanticorpi circolanti anti-cellule β del pancreas che provocano una distruzione del parenchima ghiandolare (31). La vitiligine, nei pazienti con alopecia areata, ha un'incidenza del 4% (32).

Frequenti sono infatti le alterazioni che colpiscono sia i melanociti che i cheratinociti.

-ANOMALIE DEI MELANOCITI E DEI CHERATINOCITI

Un attento esame morfologico dei follicoli piliferi nei soggetti affetti da alopecia areata, in fase attiva, mostra alterazioni regressive nei bulbi piliferi dei follicoli in anagen e una degenerazione dei cheratinociti precorticali. Anomalie significative si riscontrano anche a carico dei melanociti e della melanogenesi e comprendono sia la presenza di melanosomi anomali nelle regioni clinicamente normali, sia anticorpi diretti contro i follicoli piliferi pigmentati che spiegherebbero le alterazioni della pigmentazione osservate frequentemente in fase acuta. La correlazione tra alopecia areata e vitiligine potrebbe nascere proprio da questa comune alterazione istologica e ultrastrutturale a livello melanocitico. L'interazione cheratinociti-melanociti potrebbe infatti avere un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia (33).

I cheratinociti producono, normalmente, una grande varietà di citochine che stimolano e sostengono la proliferazione dei melanociti e la melanogenesi. Nei pazienti affetti i cheratinociti mostrano una ridotta espressione di citochine

stimolanti i melanociti (GM-CSF, SCF e bFGF) mentre gli inibitori paracrini (IL-6, TNF) sono aumentati. Il trasporto difettivo del calcio e l'alterata sintesi di matrice extracellulare, da parte dei cheratinociti danneggiati, potrebbe contribuire alla ridotta resistenza dei melanociti al danno (33). La vacuolizzazione dello strato epidermico più esterno di tutti i follicoli piliferi delle lesioni non glabre dell'alopecia areata è un'altra manifestazione degenerativa piuttosto frequente che, insieme alla presenza di melanosomi anomali, in sedi clinicamente normali, potrebbe giustificare l'ipotesi di una condizione subclinica della malattia.

-FATTORI NEUROLOGICI

Studi di microscopia e immunoistochimici hanno evidenziato nelle aree del cuoio capelluto affette da alopecia areata anomalie funzionali e morfologiche dell'innervazione delle ghiandole eccrine sudoripare. È stato ipotizzato che un neuropeptide potrebbe diffondere dalle ghiandole ed andare ad alterare il ciclo del capello, collaborando alla reazione infiammatoria associata alla malattia (34).

Alcuni autori sostengono che a rivestire un ruolo importante siano delle variazioni locali del sistema nervoso periferico a livello della papilla o dell'area del bulge che portano al rilascio di neuropeptidi che modulano vari processi infiammatori e proliferativi(35).

Hordinsky attraverso uno studio, osservò infatti una ridotta espressione del peptide correlato al gene della calcitonina(CGRP) e della sostanza P. Il primo è

un'importante agente antinfiammatorio mentre la sostanza P è in grado di inibire nel topo la crescita del pelo. Si è visto inoltre che l'applicazione di capsacina, che scatena una flogosi neuronale e il rilascio di sostanza P, nei soggetti affetti da alopecia areata aumenta tale rilascio nei nervi perifollicolari e induce la crescita del pelo vello.

-TEORIA ORMONALE

Studi recenti hanno evidenziato nei pazienti affetti una ridotta espressione del recettore della vitamina D3 (di cui sono note le funzioni ormono-simili) a livello della guaina epiteliale interna e delle cellule della papilla. Tale deficit vitaminico avrebbe delle ripercussioni sul ciclo follicolare visto l'importante ruolo della vitamina D3 nella differenziazione e cheratinizzazione del capello e considerata la sua azione immunomodulante a livello follicolare.

-TEORIA VASCOLARE

Vari autori hanno preso in esame gli aspetti microcircolatori nell'alopecia areata. Da alcuni studi è emerso che i livelli di tPA (attivatore del plasminogeno tissutale) e l'attività fibrinolitica urokinasi dipendente nei pazienti con alopecia areata in fase attiva sono diversi da quelli con alopecia areata in fase di remissione e casi

controllo. Un agente eziologico, non ancora identificato, potrebbe causare un esaurimento dell'attività fibrinolitica microvascolare tPA dipendente inducendo la formazione di depositi perivascolari di materiale simil fibrina. Ciò provocherebbe un ridotto trasferimento di ossigeno ai tessuti causando ipossia in anagen con una conseguente regressione a una fase distrofica. Inoltre l'attività fibrinolitica urochinasi dipendente peribulbare potrebbe innescare l'attivazione di elastasi e collagenasi tissutali causando la rapida espulsione dal bulbo (35).

Travisani ed al. hanno evidenziato una riduzione del flusso sanguigno a causa di un aumento significativo del tempo di filtrazione eritrocitaria. Ciò determinerebbe o aggraverebbe l'ischemia localizzata al cuoio capelluto. A livello delle chiazze alopeciche le alterazioni flussimetriche indicherebbero uno stato di vasocostrizione funzionale basale con una paradossale vaso dilatazione termoindotta, probabilmente determinata da un'anomala funzione o distribuzione delle fibre neuropeptidergiche. L'aumento dei mastociti, la cui funzionalità e indice di degranolazione risultano però ridotti, potrebbe essere imputabile proprio all'alterazione di queste fibre.

-TEORIA IMMUNITARIA

L'autoimmunità gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'alopecia. Questa osservazione deriva anche dalla frequente associazione con malattie autoimmuni e dalla presenza, nel sangue periferico, di autoanticorpi sia organo specifici (antitiroidei, anticellule parietali gastriche) ma talvolta anche non organo specifici

tra i quali ricordiamo gli anticorpi antinucleo, antimitocondrio e antimuscolo liscio. Nei soggetti affetti da alopecia areata si riscontra, inoltre, una diversa espressione degli antigeni di istocompatibilità. In soggetti normali, infatti, gli antigeni di istocompatibilità di classe I sono espressi solo a livello della porzione superficiale della guaina epiteliale esterna e solo in rari casi nella zona infrainfundibolare, compresa la matrice. Nei pazienti invece con alopecia areata vengono espressi sia antigeni di classe I che di classe II e l'espressione anormale di antigeni di classe I è di fondamentale importanza per l'interazione con i linfociti citotossici. Da un punto di vista istologico la cute del soggetto con alopecia areata si differenzia da quella di un soggetto sano per il fatto che il ricco infiltrato si localizza sia a livello perivascolare che peribulbare con una espressione da parte delle cellule endoteliali di molecole di adesione, come ICAM-1 ed ELAM-1. Nella cute sana l'infiltrato è formato invece soprattutto da CD4, mastociti, istiociti e cellule di Langherans e si ritrova solo in sede perivascolare. Nelle lesioni alopeciche si ha inoltre un'anomala espressione dell'antigene HLA-DR sulle cellule epiteliali del bulbo pilifero follicolare che contiene un ricco infiltrato di cellule T HLA-DR+. Questo infiltrato precede, però, la comparsa dell'HLA-DR sui cheratinociti che verrebbe espresso in risposta al rilascio di IFN γ da parte dei linfociti T attivati. Il passaggio di questi nel microambiente perifollicolare viene reso possibile dal riconoscimento delle molecole di adesione ICAM-1 ed ELAM-1. In seguito all'adesione alle cellule endoteliali i linfociti raggiungono le strutture bulbari dove un ipotetico antigene esogeno, ma più probabilmente endogeno, innescerebbe un processo immunologico di tipo cellulo mediato.

-IMMUNITA' UMORALE

L'immunità umorale è un importante fattore eziopatogenetico nell'alopecia areata. Esistono infatti diversi pattern anticorpali diretti contro le varie strutture del follicolo specialmente in fase anagen (35). La parte più esterna dello strato epiteliale del follicolo pilifero risulta quella più colpita, seguita dalla matrice, dalla parte più interna e dal fusto. Attraverso studi di Western Blotting Tobin et al hanno evidenziato inoltre la presenza di anticorpi antifollicoli piliferi pigmentati. Inoltre sono stati riscontrati anticorpi antiendotelio dei capillari bulbari e anticostituenti dell'unità pilare (13).

-IMMUNITA' CELLULO MEDIATA

Oltre alla positività anticorpale contro le strutture del follicolo pilifero ad avvalorare l'ipotesi che l'alopecia areata sia una patologia autoimmune organospecifica esistono anche noti esperimenti. Gilhar dimostrò che l'alopecia areata può essere indotta negli espianti di cuoio capelluto umano, prelevati da pazienti affetti e trapiantati nei topi con immunodeficienza severa combinata (SCID) a causa del trasferimento dei linfociti T autologhi isolati dal cuoio capelluto interessato dal processo (36). I linfociti T che erano stati coltivati con omogenati follicolari insieme a cellule presentanti l'antigene furono capaci di indurre le variazioni tipiche dell'alopecia areata: la caduta dei capelli, l'infiltrato di linfociti T perifollicolare,

l'espressione a livello dell'epitelio follicolare dell'HLA-DR e della molecola di adesione intercellulare -1. Le cellule T che non erano state coltivate con gli omogenati follicolari non indussero l'alopecia areata. Da qui la deduzione che nell'alopecia areata le cellule T riconoscano un autoantigene follicolare. Sembra inoltre che la patologia sia mediata dai linfociti T e in particolare dai CD8+. Esistono tuttavia pareri contrastanti riguardo i livelli di linfociti T circolanti. Secondo alcuni autori il numero totale sarebbe aumentato, secondo Friedmann e altri si ridurrebbe in base alla gravità della malattia (35). Si verificherebbe un incremento del rapporto CD4/CD8 a causa di un lieve incremento dei linfociti T helper (CD4) e di un decremento dei T suppressor, correlato con la caduta complessiva dei capelli. Tuttavia, in base alla nostra esperienza non possiamo affermare che esista un'alterazione significativa nel sangue a livello linfocitario.

6. IPOTESI PATOGENETICA

Nonostante la patofisiologia dell'alopecia areata resti, a tutt'oggi, non del tutto chiarita, si è giunti a ritenere che "l'area Celsi" sia il risultato di una turba dei meccanismi di sorveglianza immunitaria comportante un'aggressione di costituenti self rappresentati da antigeni follicolari da parte dei linfociti T (37). A livello del follicolo pilifero il sistema immune è diverso da quello della cute circostante: linfociti T intrafollicolari, cellule di Langherans, mastcellule e macrofagi importanti per la crescita follicolare e valido sistema di difesa antinfettiva (38). Le cellule di Langherans, di cui il follicolo può rappresentarne una valida riserva, hanno quindi un importante ruolo nell'immunosorveglianza data anche la loro localizzazione nello strato epiteliale più esterno del follicolo pilifero. Le cellule NK e i linfociti T non rivestono invece un significato così rilevante nella protezione contro agenti esterni. L'epitelio del follicolo pilifero prossimale in fase anagen rappresenta una zona di privilegio immunologico (come la corteccia cerebrale, la cavità oculare, l'vaio e il testicolo) caratterizzata da una bassa espressione di MHC di classe I e da una sintesi di potenti immunosoppressori a livello locale (36). Il follicolo ha quindi la possibilità di eludere il sistema immunitario. Tale concetto è supportato da numerosi esperimenti che dimostrano come mentre alcune porzioni di cute se trapiantate vengono rigettate, il follicolo pilifero non viene rigettato. La sopravvivenza di melanociti allogenici consente di sequestrare antigeni dal riconoscimento immunitario e di proteggere il bulbo da una risposta immune autoaggressiva potenzialmente deleteria. Nell'alopecia areata questo privilegio immunitario viene

meno o per una ridotta capacità difensiva da parte dei melanociti o per un possibile eccesso di antigene con conseguente attivazione dei linfociti T CD8+ autoreattivi diretti contro l'autoantigene follicolare recentemente esposto (40). L'aumento di cellule apoptotiche è l'espressione diretta della tossicità linfocitaria presente nell'infiltrato perifollicolare. Esistono infatti cellule citotossiche esprimenti GBmRNA (RNA messaggero per i granzimi) a stretto contatto con il follicolo pilifero. Il processo apoptotico è mediato dai granzimi che sono serinoproteinasi contenute all'interno dei granuli dei linfociti citotossici (NK e linfociti T citotossici). Sembra infatti che la guarigione dalla malattia possa essere indotta attraverso la deplezione dei CD8+. Nei pazienti affetti da alopecia areata le cellule apoptotiche si osservano sia a livello della papilla, sia a livello del foglietto epiteliale più esterno del follicolo pilifero. Nei soggetti sani l'apoptosi si verifica soltanto a livello dell'epidermide e della matrice dei capelli mentre l'espressione di Bcl2 protegge la papilla da questa distruzione. Nell'alopecia areata la presenza di Bcl2 sembra però non ostacolare il processo apoptotico, favorito inoltre da un'espressione anomala dell'antigene Fas a livello dei cheratinociti epiteliali. Questo antigene è una proteina di membrana implicata nell'apoptosi che fa parte della superfamiglia del recettore di un fattore di necrosi tumorale o di crescita neurale. La sua espressione è transitoria e non si hanno, a tutt'oggi, dei metodi efficaci per evidenziarla. Le cellule che esprimono il ligando per il Fas legano questo recettore e i cheratinocidi vanno incontro a morte. Anche i CD4+ possono esprimere un ligando per il Fas. Un'altra teoria affascinante che potrebbe spiegare l'induzione dell'alopecia areata è stata formulata da Paus. Egli ritiene che il riconoscimento degli antigeni follicolari, immunologicamente privilegiati, possa essere determinato o comunque favorito da un up-regulation di

immunosoppressori prodotti localmente come ad esempio gli ormoni stimolanti i melanociti, l'adrenocorticotropina il TGF β (41).

Capire cosa determina l'espressione ectopica delle MHC di classe I nel bulbo in anagen è un punto chiave non soltanto da un punto di vista clinico, ma soprattutto terapeutico, in quanto un trattamento farmacologico più mirato potrebbe garantire la risoluzione definitiva della malattia

7. ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI

Le cellule che appaiono più sensibili agli attacchi autoimmuni sono quelle che si riproducono più velocemente. Da numerosi studi è emerso infatti che il follicolo pilifero risulta più suscettibile a qualsiasi noxa patogena quanto più è elevata la sua attività mitotica. Nell'alopecia areata il bersaglio principale sono i follicoli nelle prime fasi dell'anagen che rappresentano quelle più vulnerabili del ciclo. I follicoli in telogen sono invece caratteristicamente risparmiati. I quadri anatomico-patologici non si differenziano tanto in base all'età, al sesso, alla razza dei pazienti affetti ma variano soprattutto in relazione alla fase della malattia (39). L'infiltrato infiammatorio peribulbare a "sciame d'api" è di solito considerato il reperto istopatologico essenziale per formulare una diagnosi certa di alopecia areata. Questo comprende soprattutto linfociti T attivati (CD3, TCR $\alpha\beta$), che indicano l'attivazione di un processo autoimmune, macrofagi (CD68), cellule di Langherans (CD1a+), CD25 (catena α del recettore dell'IL-2), livelli elevati di IFN γ e citochine proinfiammatorie (IL1 β), tipico di un infiltrato linfocitario Th1. La prevalenza di citochine che contribuiscono all'attivazione e al mantenimento del processo flogistico, rispetto a quelle antinfiammatorie (come ad esempio IL-4, IL-10...) potrebbe giustificare la persistenza delle chiazze alopeciche. I cheratinociti, a contatto con l'infiltrato, mostrano un' HLA-DR positività più marcata rispetto alla cute sana circostante (40).

La formazione di microvescicolazioni, la comparsa di edema, l'innescarsi di processi apoptotici e necrotici, l'attivazione macrofagica e di cellule giganti, a livello della

papilla dermica, sono tutti fenomeni che possono derivare dall' infiammazione stessa.

Da alcuni prelievi biotici è però emerso che l'infiltrato linfocitario non è sempre presente in tutti i pazienti, quindi, in assenza di questo, la presenza di capelli miniaturizzati o un'alta percentuale di capelli in telogen possano comunque indurre il sospetto di alopecia areata .

Nello stadio acuto della patologia si evidenziano numerosi follicoli sia in catagen che in telogen circondati da uno scarso infiltrato infiammatorio linfocitario. Al contrario i follicoli in anagen sono circondati da un denso infiltrato peribulbare e perivascolare.

Follicoli nelle prime fasi dell'anagen, in particolare III e IV, caratterizzati da un importante infiltrato peribulbare a "sciame d'api" sono invece caratteristici dei pazienti affetti da alopecia areata totale o universale o dei pazienti con chiazze stabili. Un altro aspetto caratteristico è dato dalla presenza di capelli miniaturizzati con tratti fibrosi in cui si riscontra un'incontinenza del pigmento. Durante la fase attiva di caduta i melanociti e le cellule della matrice risultano ridotti e i fusti displastici. Il follicolo danneggiato entra così nell'ultimo stadio della fase telogen e catagen. Si ha quindi un aumento di capelli in catagen e telogen con una riduzione del rapporto anagen/telogen.

Nei soggetti affetti da alopecia areata di vecchia data si ha un arresto follicolare nell'ultimo stadio della fase telogen, una miniaturizzazione e una ridotta densità follicolare insieme a un incremento delle cellule di Langherans. Nella fase di risoluzione della malattia si è evidenziato un massivo aumento di capelli in anagen,

con ricrescita dei capelli miniaturizzati, risoluzione dello stato infiammatorio e con scomparsa dell'infiltrato linfocitario peribulbare (39).

Alcuni autori hanno inoltre rilevato depositi di immunoglobuline, fibrina e complemento nei tessuti sede di ricrescita degli annessi (10). Tale evidenza potrebbe spiegare il coinvolgimento dei Th2 che attualmente si dibatte. Un accurato studio istologico può essere effettuato solo se i campioni bioptici vengono sezionati orizzontalmente. Quando nei pezzi bioptici l'infiltrato linfocitario peribulbare è assente è importante ricercare gli eosinofili a livello sia dei tratti fibrosi che a livello dell'infiltrato peribulbare. La loro presenza è infatti importante per fare diagnosi di alopecia areata insieme a una significativa correlazione clinica. Inoltre, a evidenziare come l'alopecia areata non sia un processo localizzato è l'osservazione, attraverso il microscopio elettronico, di microsezioni di follicoli piliferi da cui emergono anomalie strutturali a livello della papilla dermica sia dei follicoli coinvolti dal processo che di quelli clinicamente normali.

All'immunoistochimica si osserva una marcata espressione di ICAM-1 nella papilla dermica e nei cheratinociti della matrice e dello strato epiteliale più esterno del follicolo pilifero (41). Dalle indagini su tessuto un altro reperto significativo è quello inerente alla linea cellulare OKT6+. Tale marcatore di superficie oltre che a livello infundibolare sarebbe espresso anche in porzioni più profonde del follicolo e in seno all'infiltrato periannessiale (10).

L'esame istologico è anche importante per fare una corretta diagnosi differenziale con patologie come l'alopecia androgenetica, il telogen effluvium, la tricotillomania e l'alopecia luetica (42). Nell'alopecia androgenetica sono presenti capelli

miniaturizzati ma l'infiltrato linfocitario infundibolare e l'incontinenza di pigmento nei tratti fibrosi è assente.

Il telogen effluvium si caratterizza solo per una lieve riduzione del rapporto anagen/telogen. Follicoli in anagen, molti capelli in fase catagen e tricomalacia sono invece i tre aspetti essenziali della tricotillomania.

L'alopecia luetica, a differenza dell'alopecia areata dove gli eosinofili peribulbari sono numerosi, si caratterizza per pochi o nessun eosinofilo a livello peribulbare mentre prevalgono plasmacellule e linfociti nell'istmo e nella zona peribulbare.

8. IL PRIVILEGIO IMMUNOLOGICO

Si definisce privilegio immunologico(IP) la peculiare caratteristica di specifiche aree dell' organismo nelle quali tessuti estranei alle stesse e in esse trapiantati possono sopravvivere per un lungo periodo. Questa condizione, definita da prove ed evidenze sperimentali, va contro i normali processi immunologici fondati soprattutto sulle conoscenze derivanti dall' immunologia dei trapianti. È infatti notevole e sostanziale la differenza relativa alle altre aree dell' organismo in cui l' impianto di un tessuto estraneo conduce ad un rigetto acuto dello stesso.

Le ricerche su questo argomento si sono sviluppate a partire dalle osservazioni della biologia e della fisiologia di alcuni organi specifici e notevolmente importanti per la sopravvivenza della specie. La presenza dei peli e dei capelli nell'uomo non è più fondamentale per la sopravvivenza ma, evidentemente, nell'evoluzione della specie, la modificazione adattativa del genoma ha lasciato ai follicoli piliferi un ruolo importante.

Il primo sito di IP venne descritto nel 1873 dall' oculista tedesco Van Dooremal il quale, trapiantando cute felina nella camera anteriore dell' occhio di un cane, registrò una prolungata sopravvivenza della struttura trapiantata. Il privilegio immunologico (IP) interessa, oltre al follicolo pilifero (HF) , altri organi "critici" come ad esempio la camera anteriore dell' occhio, le ovaie e i testicoli, la corteccia surrenalica, il SNC e l' unità feto-materno-placentare ma la caratteristica saliente

del follicolo pilifero rispetto a tutti gli altri siti è la sua ciclicità in accordo alla fisiologia del capello stesso.

In queste strutture il compito del privilegio immunologico è prevenire una reazione distruttiva di natura immunitaria che causerebbe patologie più o meno gravi fino alla perdita di funzione dell'organo in questione: per esempio l'alterazione dell'IP della camera anteriore dell'occhio porta ad uveiti e quindi, in ultimo, a cecità, nel SNC può condurre a Sclerosi Multipla (SM), orchite post parotite nel testicolo e rigetto fetale se associato ad alterazione della placenta.

Nel follicolo pilifero la struttura anatomica e le funzioni da essa svolte sono alla base del privilegio immunologico. È caratteristica la ciclica presenza dell'IP nella fase di anagen per assistere, poi, ad una progressiva diminuzione fino a scomparire nella fase di catagen e telogen. In anagen il privilegio immunologico è confinato in larga parte in quei compartimenti del follicolo pilifero come la matrice e la guaina interna che sono continuamente generati ex novo grazie all'azione delle cellule follicolari staminali e che vengono eliminati in ogni regressione del follicolo guidata da meccanismi apoptotici (catagen). Conferme e prove ulteriori a riguardo di ciò si hanno dallo studio del ciclo del capello in relazione alla melanogenesi

Oltre al bulbo nella fase anagen, studi sul bulge mostrano come questo presenta un efficace IP, probabilmente anche più forte di quello del bulbo in anagen. A livello delle bulge, è fortemente presente l'espressione genetica del CD200, una glicoproteina di superficie in grado di attenuare la risposta infiammatoria agendo da potente immunosoppressore a livello delle cellule staminali della bulge(49). L'azione di questa proteina è fondamentale per evitare la distruzione immunologica delle

cellule staminali del follicolo, e permettere lo svolgersi del normale ciclo del bulbo . Questa regione è inoltre caratterizzata dalla presenza di down regolazione di MHC di classe I e II e di $\beta 2$ microglobulina mentre c'è l'upregolazione delle molecole immunosoppressive IDO, α MSH, MIF e TGF β 2. Le cellule CD200 del bulge esprimono HLA-E ed inoltre l'IFN γ induce una significativa espressione ectopica di MHC di classe I non solo nella guaina esterna della radice ma anche nel bulge delle cellule messe a coltura. La presenza del bulge in relazione al privilegio immunologico probabilmente protegge il follicolo pilifero da un attacco immunitario diretto contro le cellule staminali contenute in questa regione e una perdita del privilegio immunologico del bulge può condurre alla perdita totale delle cellule staminali quindi allo sviluppo dell'alopecia cicatriziale. A livello del bulge la molecola CD200 si lega al suo recettore specifico CD200R e causa l'aumento delle cellule T regolatorie e IDO (indoleamina 2-3 diossigenasi). La reattività per il CD200 è localizzata appunto a livello del bulge nella regione più esterna della guaina esterna della radice tra l'inserzione del muscolo erettore pilifero e la ghiandola sebacea.

È evidente come questo processo sia quindi dinamico, ristretto ad alcune zone specifiche del follicolo ed assente nelle fasi di catagen e telogen. In condizioni normali le strutture immunologiche presenti nel follicolo sono, quindi, notevolmente importanti e possono essere così elencate (50):

- assenza di strutture linfatiche
- down regolazione di molecole MHC I e II e quindi diminuzione dell'attività dei CTL e delle APC

- down regolazione di molecole come $\beta 2$ microglobuline e TAP 2 (trasportatore dell' antigene processing) implicate nell' espressione delle MHC
- rara ,o comunque minima, distribuzione di CD4+, CD8+ , NK e cellule di Langerhans.
- inibizione della risposta NK mediata attraverso una serie di inibitori per NK.
- espressione di Fas Ligando ed eliminazione di tutte le strutture auto-reattive che esprimono Fas
- mancata / ridotta modulazione dei segnali costimolatori appropriati
- produzione locale di potenti molecole immunosoppressive come TGF β , IL-10, α MSH, MIF.
- iper- espressione di citochine immunosoppressive
- modulazione dell' infiammazione da parte di neuropeptidi (sostanza P, VIP, CGRP).
- induzione della tolleranza per gli antigeni derivanti dai tessuti costituenti il privilegio immunologico.
- costituzione di specifiche barriere della matrice extracellulare in grado di intralciare il lavoro delle cellule immunologiche.

MHC: STRUTTURA E FUNZIONI IN CONDIZIONI NORMALI.

Il mantenimento del privilegio immunologico nel follicolo pilifero è fortemente legato alla down-regolazione dell' espressione dei complessi MHC perché, la loro scarsa espressione determina una diminuita/ assente presentazione degli autoantigeni e alloantigeni ai linfociti T tutelando l' immunità del follicolo.

I geni dell' MHC vennero inizialmente identificati come responsabili del rapido rigetto dei trapianti e sin dall' inizio vennero implicati nel riconoscimento di molecole self/non self e quindi coinvolti nelle risposte immunitarie umorali e cellule - mediate. L'MHC è una vasta regione del DNA che codifica per molecole MHC I e II. I geni sono altamente polimorfi e per alcuni di essi esistono anche più di 250 alleli all' interno della popolazione umana. oltre a geni polimorfi di I e II classe, però, l' MHC contiene anche geni che codificano per componenti del sistema del complemento (C4, Fattore B, C2) , per citochine (LT beta, TNF alfa, LT), per proteine coinvolte nella processazione dell' antigene (TAP1-2).

Dal punto di vista dell' ereditarietà le molecole MHC sono espresse in modo codominante in ogni individuo e quindi ciascun soggetto esprime entrambi gli MHC ereditati da ciascun genitore; dal punto di vista funzionale questo fattore è molto importante perché massimizza il numero delle molecole MHC disponibili a legare i peptidi per la presentazione dell' antigene ai linfociti T. La I classe è espressa su tutte le membrane delle cellule nucleate ad esclusione della membrana dei globuli rossi mentre le MHC II sono espresse sulla membrana di cellule nucleate presentanti l' antigene (APC) e quindi: cellule dendritiche, macrofagi e cellule B. La

funzione dell' MHC è appunto quella di presentare ai linfociti T l' antigene ad esso associato ma solo dopo che una serie di specifici processi intracellulari hanno processato l'antigene stesso in peptidi, nella forma, cioè, funzionale all' esposizione MHC mediata e al riconoscimento TCR mediato. Il recettore delle cellule T (TCR) è in grado di riconoscere i peptidi antigenici associati a MHC tramite il riconoscimento di due residui polimorfi propri dell' MHC stesso e un residuo del peptide per il contatto con il linfocita T. Le cellule T citotossiche (CTL, CD8 +) riconoscono i peptidi legati all' MHC I mentre le cellule T helper (Th, CD4+) riconoscono i peptidi legati a MHC II. Il diverso meccanismo di riconoscimento implica, quindi, una diversa funzione delle cellule stesse infatti, generalmente, per l' attivazione dei CD8+ il meccanismo di processazione sottenderà una fase citosolica e determinerà una risposta cellulo-mediata con conseguente lisi delle cellule che lo hanno attivato. Per quanto riguarda CD4+ la processazione, che avviene attraverso vescicole endosomiali, determinerà la produzione di citochine che contribuiranno, attraverso la linea Th1, ad attivare i CTL CD8+ mentre, tramite la linea Th2, verranno attivati i linfociti B.

Si può concludere che ad una diversa struttura corrispondano diversi meccanismi di processazione e riconoscimento e, in ultimo, una diversa funzione infatti:

-CD8+ , ristretto per MHC I, agisce attraverso meccanismi di citotossicità su cellule infettate da micro-organismi intracellulari come i virus; dal punto di vista funzionale questo fenomeno è molto importante poiché i virus possono infettare potenzialmente tutte le cellule nucleate. è perciò necessariamente richiesto, al fine

di proteggere la struttura cellulare, un sistema di esposizione degli antigeni che sia presente in tutte le cellule nucleate (potenzialmente esposte a rischio infettivo).

-CD4+, ristretto per MHC II, svolge funzioni che prevedono il riconoscimento dell'antigene presentato da un numero più limitato di tipi cellulari. I linfociti T naive riconoscono gli antigeni presentati dalle cellule dendritiche negli organi linfoidi secondari mentre i linfociti T differenziati attivano e/o coadiuvano i macrofagi nell'eliminazione dei microbi fagocitati e attivano i linfociti B per la produzione di anticorpi atti ad eliminare micro-organismi extracellulari.

L'espressione delle molecole MHC è aumentata dalle citochine: molecole prodotte durante la risposta immunitaria innata e specifica. Gli interferoni, IFN α , IFN β , IFN γ , aumentano l'espressione delle MHC I durante la risposta innata contro molti virus mentre il tumor necrosis factor (TNF) e la linfotossina (LT) aumentano l'espressione delle MHC ma in risposta a molti microrganismi. In questo modo l'immunità innata stimola i linfociti T e quindi l'immunità specifica. Le molecole di classe II sono regolate principalmente da IFN γ che è in grado di aumentarne l'espressione. Esso è prodotto dalle cellule NK durante la risposta immunitaria innata (e quindi collega l'immunità innata a quella specifica); è, inoltre, prodotto dai linfociti T attivati dal contatto con l'antigene durante la risposta immunitaria specifica ed è quindi in grado di amplificare questo tipo di risposta stimolando l'espressione delle MHC. Il TNF aumenta l'espressione dell'MHC II nelle cellule dendritiche e lo stesso effetto è ottenuto nei linfociti B attraverso l'IL 4. Le citochine potenziano l'espressione di MHC tramite la stimolazione della velocità di trascrizione: in particolar modo l'IFN γ stimola la trascrizione del CIITA (induttore di

trascrizione della classe II). il CIITA è una proteina che viene legata da diversi fattori di trascrizione a costituire un complesso che si lega ai promotori della classe II e sarà in grado di determinare un' efficiente trascrizione. Il ruolo dell' IFN γ non è limitato solo alla trascrizione di MHC I e II ma notevole è anche la sua funzione nella trascrizione della $\beta 2$ microglobulina , dei geni codificanti le unità del proteasoma e dei geni che codificano le subunità dell' eterodimero TAP fondamentali per la processazione dell' antigene.

Le molecole associate al primo tipo sono formate da un polipeptide transmembrana , codificato dall'MHC, associato alla $\beta 2$ -microglobulina, una molecola invariante codificata dal cromosoma 15. Le molecole di Classe II sono presenti solo su alcune cellule immunocompetenti, in grado di effettuare la presentazione dell'antigene quali cellule dendritiche, linfociti B e macrofagi. Inoltre la loro presenza, anche su queste cellule, non è costante, ma soggetta a modulazione, cioè possono essere presenti o meno a seconda dello stato di attivazione della cellula e la loro espressione viene modulata dalla presenza di alcune interleuchine e/o interferoni. Le molecole di Classe II sono proteine di membrana eterodimeriche, formate cioè da una catena α , e da una catena β , entrambe codificate dall'MHC. Si evidenzia , inoltre, una terza catena, detta invariante, che non attraversa la membrana cellulare. Questa catena invariante ha funzione di chaperon e di indirizzamento del complesso MHC-II dal reticolo endoplasmatico alle vescicole, dove viene degradata lasciando solo un frammento di essa (CLIP) a occupare il sito in cui andrà a collocarsi successivamente il peptide da esporre.

La tasca che lega i peptidi per l' MHC I può accogliere peptidi costituiti da 8-11 residui amminoacidici mentre per le molecole MHC II è permesso il legame con molecole più grandi che possono avere legami con peptidi di dimensioni pari a circa 30 residui.

Le molecole MHC legano un peptide alla volta e tutti i peptidi che si legano ad una determinata cellula MHC condividono delle caratteristiche comuni. Il legame è saturabile con una cinetica di dissociazione molto lenta e a questa caratteristica biochimica è associato un notevole vantaggio funzionale: maggiore è il tempo di dissociazione, infatti, maggiore sarà la durata del legame tra il peptide e l' MHC così, viene assicurato un tempo sufficientemente lungo tale da permettere il contatto, quindi il riconoscimento, idoneo da parte dei Linfociti T.

Le molecole umane dell' MHC sono chiamati HLA (antigeni leucocitari umani) a causa dell' espressione, sui leucociti umani, di alloantigeni ossia antigeni che inducono una risposta immunitaria quando vengono trasferiti in altri individui della stessa specie. Gli alloantigeni sono i prodotti dei loci genetici polimorfi raggruppati in una regione situata sul cromosoma 6 e sono riconosciuti da specifici alloanticorpi. Lo studio dell' HLA è stato condotto su diverse famiglie e all' inizio si è svolto seguendo criteri di indagine puramente sierologici. I primi 3 geni definiti con questo approccio furono : HLA-A, HLA-B, HLA-C. Quando a questo tipo di indagine vennero associati studi sulla reazione leucocitaria mista (test per il riconoscimento delle cellule allogene da parte dei linfociti T) si osservò che i linfociti T di un individuo in vitro erano capaci di proliferare in presenza di leucociti di un altro individuo. Il primo gene identificato con questi studi venne qualificato come HLA-D e la proteina da esso codificata venne chiamata HLA-DR; nelle adiacenze della regione genetica

HLA-DR vennero trovati altri due geni: HLA- DQ e HLA- DP. Gli HLA-A, HLA-B, HLA-C sono identificati come geni MHC di I classe mentre gli HLA-DP, HLA- DQ , HLA- DR sono identificati come MHC di classe II. La serie degli alleli presenti in ciascun cromosoma è detto aplotipo MHC e ogni allele ha una designazione numerica; in condizioni di eterozigosi, ovviamente, si hanno due aplotipi HLA. Nell' uomo gli alleli HLA collocati in loci diversi vengono ereditati insieme in modo più frequente di quanto avverrebbe solo su base casuale e questo fenomeno è detto "linkage disequilibrium", uno strumento importante per individuare regioni cromosomiche di limitata ampiezza in cui si collocano i geni per una determinata malattia (mappaggio ad alta risoluzione).

MOLECOLE IMMUNOSOPPRESSIVE

1. ORMONI: MSH, ACTH

Il ruolo più importante della cute è la sua funzione di guardiano contro gli stress esterni (raggi UV, energia meccanica, chimica e biologica) ma altrettanto importante è il ruolo che riveste nei confronti degli stress psico-emotivi. Quest' ultimi cambiano l' omeostasi della cute e questo è dimostrato dal fatto che la dermatite atopica, l' alopecia e altre malattie cutanee peggiorano durante i periodi di stress. Al fine di mantenere un normale status biologico la cute deve poter rispondere ad ogni tipo di stress. La molecola attivatrice dell' asse responsabile del mantenimento di questo sistema biologico di difesa è il CRH. CRH è l' elemento

prossimale dell' asse ipotalamo-ipofisi-surrene ed è stato ritrovato nei cheratinociti del follicolo pilifero soprattutto a livello della guaina esterna della radice, della regione basale dell' epidermide e della matrice dell' anagen; la sua espressione mostra cambi durante il ciclo del follicolo con picchi durante la fase anagen e bassi livelli durante la fase catagen e telogen. il follicolo umano può essere considerato a tutti gli effetti un equivalente funzionale periferico del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene. Infatti stimola la secrezione di POMC a livello ipofisario, precursore di α MSH e ACTH; quest' ultimo ormone a livello surrenalico genera cortisolo che controlla la produzione di CRH tramite un meccanismo di feedback negativo. È da definire come lo stress emozionale sia relazionato al follicolo e all' asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Gli stress emotivi potrebbero alterare la produzione da parte del sistema nervoso periferico degli ormoni neurali, molecole in grado di modulare il sistema ipotalamo-ipofisi -surrene nel controllo del danno dello stress periferico. Questo sistema di controllo, inoltre, è fortemente relazionato alle mast-cellule, discusse in seguito, ma è dotato anche di un' azione immunosoppressiva intrinseca agli ormoni coinvolti in questo sistema.

Gli ormoni responsabili dell' immunosoppressione derivano da POMC (51) .

La proopiomelanocortina umana (POMC) è una proteina di 267 aminoacidi sintetizzata principalmente nell'ipofisi, nel nucleo arcuato dell'ipotalamo, nel tratto solitario della medulla, nella pelle e nel sistema immunitario. Essa è precursore di numerosi altri peptidi biologicamente attivi derivati da un processing post-traduzionale operato da specifici enzimi, le proconvertasi 1 e 2 (PC1 e PC2): α -, β - e γ -MSH, ormone adrenocorticotropo (ACTH), le lipoproteine e β -endorfina che

hanno attività biologiche differenti a secondo del recettore della melanocortina al quale si legano. L'attività dei peptidi derivati da POMC viene mediata da una famiglia di proteine- recettore leganti la guanosina trifosfato

Alcuni studi hanno mostrato come gli ormoni derivanti da POMC possono essere implicati nel mantenimento del privilegio immunologico . Metodi immunoistochimici consentono di evidenziare la diversa espressione delle molecole HLA e della $\beta 2$ microglobulina in risposta alle concentrazioni di IFN γ . L' IFN γ è in grado di indurre un' over-espressione degli HLA e della $\beta 2$ microglobulina e quindi è in grado di attivare una maggiore risposta dei linfociti T CD8+. Gli effetti esercitati dalla presenza dei peptidi derivanti da POMC (ACTH, α MSH, β endorfine) su questo meccanismo immunologico sono evidenziati dalle indagini immunoistochimiche. È importante, a tale proposito, l' osservazione che, sebbene a livelli di concentrazione diversi, questi tre ormoni diminuiscono la sintesi di IFN γ e quindi diminuiscono l' induzione della risposta immunitaria influenzando i livelli di HLA I e $\beta 2$ microglobulina ma senza andare ad alterare i livelli di HLA II. È , così, evidente l' importanza degli ormoni derivanti da POMC e il loro ruolo immunomodulatore con funzioni immunosoppressive nel mantenimento del privilegio immunologico che si esplica soprattutto in fase anagen (52,53,54,55).

La trascrizione dei geni per POMC è strettamente dipendente dalla fase del ciclo in cui si trova il capello con un notevole aumento durante l' anagen.

Nella cute in condizioni normale l' ACTH si ritrova nella guaina esterna della radice durante l' anagen e non è riscontrabile in nessun altra struttura cutanea

(epidermide e derma) al di fuori del follicolo e la sua funzione è quella di generare cortisolo intrafollicolare.

MSH è rilevato, anch' esso, in anagen nella guaina esterna della radice e nella matrice

2. ORMONI DELLO STRESS E MAST-CELLULE.

Le mast cellule sono fortemente correlate al mantenimento del privilegio immunologico in relazione alla loro azione durante lo stress ormonale (56). Esse sono distribuite attorno al follicolo pilifero e la loro degranolazione è in grado di influenzare il normale ciclo del follicolo pilifero murino. Si è osservato che la loro degranolazione aumenta in modo importante nella fase tardiva dell' anagen, immediatamente prima della fase catagen (che è ritardata, nella sua comparsa, dal blocco della degranolazione mastocitaria) e perciò è possibile concludere che ha un andamento ciclico. Questo processo è indotto da molecole, dette secretagoghi, come la sostanza P ma può essere causato anche dal CRH che induce la degranolazione di mast cellule nelle colture in vitro di follicoli umani tramite la stimolazione con SCF (stem cell factor). Questa evidenza fornisce un dato di ampia rilevanza a favore dell' importanza delle connessioni tra il sistema ormonale ed immunitario e ci aiuta nella comprensione dei rapporti esistenti tra stress e perdita dei capelli che si può riassumere nel modo in seguito proposto. Un agente stressante è in grado di indurre la produzione di CRH nel follicolo pilifero e di

aumentare il numero e la maturazione delle mast-cellule tramite la presenza di stem cell factor (SCF); se il CRH stimola la produzione di questa citochina si produrrà la degranolazione delle mast cellule che , attraverso il rilascio di mediatori chimici, induce la fase catagen.

3. FATTORI DI CRESCITA: TGF

È un fattore di crescita immunosoppressivo che si esprime nella fase terminale dell' anagen e nella fase iniziale del catagen. Il suo ruolo fondamentale è , in associazione con ACTH, MSH e cortisolo, sottrarre il follicolo in anagen e/o gli antigeni associati alla melanogenesi dal riconoscimento mediato dalle cellule CD8 + autoreattive.

4. CITOCHINE

Le citochine sono polipeptidi prodotti in risposta ad antigeni la cui funzione è regolare le reazioni immunitarie ed infiammatorie. Esse sono strutturalmente diverse tra loro ma condividono alcune proprietà biologiche comuni:

- La loro secrezione avviene solo dopo la stimolazione della cellula che provoca la trascrizione ex novo di specifici geni. Tale attivazione è rapida, immediata e transitoria, inoltre la maggior parte degli mRNA sono instabili e la sintesi della citochina può avvenire solo per un breve periodo di tempo; non sono

comunque da escludere i meccanismi di splicing alternativo e i meccanismi post-trascrizionali.

- Le attività biologiche indotte dalle citochine sono spesso pleiotropiche e ridondanti. Si intende, per pleiotropismo, la capacità di svolgere la propria azione su diversi tipi cellulari e quindi permette di mediare diversi effetti biologici; il termine ridondanza, invece, si riferisce al fatto che un determinato effetto biologico può essere indotto da più citochine. Queste due caratteristiche hanno diverse implicazioni dal punto di vista terapeutico: il pleiotropismo, infatti, determina lo sviluppo di effetti collaterali mentre la ridondanza limita il potenziale terapeutico di antagonisti specifici per una citochina.

- Influenzano l'attività biologica di altre citochine. Esse possono stimolare la produzione di altre citochine, antagonizzarsi a vicenda, produrre effetti additivi o sinergici.

- Gli effetti possono essere locali o sistemici

- L'attivazione delle citochine avviene attraverso la trasduzione del segnale possibile solo dopo il legame tra citochina e specifici recettori presenti sulla cellula bersaglio.

I recettori legano le citochine con un'elevatissima affinità perciò concentrazioni estremamente basse sono sufficienti a legare il recettore specifico inducendo il relativo effetto biologico. L'elevata affinità è, inoltre, utile a sopperire anche alla bassa espressione dei recettori per le citochine presenti sulle cellule. Tutti i recettori hanno almeno un dominio transmembrana, un dominio extracellulare (deputato al

legame) e un dominio intracellulare (deputato al legame con le molecole della trasduzione). Si distinguono 5 famiglie recettoriali: recettori di tipo I, recettori di tipo II, superfamiglia delle Ig, recettori per il TNF e recettori a 7 domini transmembrana ad α elica detti anche recettori a serpentina.

I recettori di tipo I, sono strutturalmente costituiti da una o più copie di un dominio composto da due coppie di residui di cisteina e, più prossimalmente alla membrana plasmatica, da una sequenza triptofano-serina X-triptofano-serina (dove per X si intende qualsiasi aminoacido). Questa struttura è funzionale al legame con molecole che si ripiegano in quattro catene ad α elica e la specificità per le diverse citochine è conferita da residui amminoacidici diversi da un recettore all' altro. La trasduzione del segnale avviene attraverso la via JAK/ STAT, in cui la fosforilazione di JAK induce il reclutamento di STAT e il legame con i recettori per le citochine a cui segue dimerizzazione degli STAT , traslocazione nel nucleo cellulare e quindi trascrizione dei geni responsivi a questa citochina. I recettori di tipo II condividono con quelli di tipo I la presenza di domini conservati ricchi di cisteina ma non hanno la sequenza triptofano-serina X-triptofano-serina e la stessa via di trasduzione. Il dominio per le Ig ha domini extracellulari simili a quelli delle Ig e legano diverse citochine.

I recettori per il TNF hanno un dominio extracellulare ricco in cisteina e una volta attivati sono in grado di modificare l' espressione genica e di indurre apoptosi. Questo meccanismo si attua attraverso la presenza del legame con domini di morte (inducono apoptosi mediante il legame con le caspasi) o con una proteina adattatrice (TRADD) che si lega a molecole intermedie importanti nella trasduzione

del segnale (TRAF e RIP) che attivano le chinasi e generano fattori di trascrizione attivi come l' AP-1 e NF- κ B. I recettori a serpentina sono caratterizzati da questo speciale dominio transmembrana e a livello intracellulare sono associati a proteine G: sono specifiche delle chemochine. È importante ricordare che i livelli di espressione dei recettori e, quindi, la responsività cellulare sono regolati da segnali esterni. Questa caratteristica è fondamentale per assicurare la specificità della risposta immunitaria nonostante le citochine non siano dotate di alcuna specificità per l' antigene. Ad esempio: la stimolazione antigene mediata dei linfociti T porta all' aumento dell' espressione dei recettori per le citochine sulla loro superficie, in questo modo i linfociti antigene specifici assumono una maggiore responsività alle citochine rispetto a quella di linfociti non attivati.

La risposta cellulare alla stimolazione da parte delle citochine porta a modificazioni della funzionalità cellulare sia con sia senza modificazioni dell' espressione genica. Questo meccanismo implica che il legame con il recettore nella cellula bersaglio attiva la trascrizione di geni fino ad allora silenti che possono provocare: proliferazione della cellula bersaglio, switch delle Ig, specializzazione dei T helper in Th1 e Th2 e attivazione dei meccanismi microbici. Non c' è alterazione del profilo genetico nei casi delle chemochine e del TNF. Le chemochine inducono una rapida migrazione cellulare mentre il TNF induce l' apoptosi tramite l' attivazione di enzimi cellulari.

IL 1: è prodotta essenzialmente da macrofagi, cellule endoteliali ed alcune cellule epiteliali. Esistono due forme di IL1: IL1- α e IL1- β . Esse hanno un grado di omologia non superiore al 30 % e sono in grado di legarsi allo stesso recettore di membrana

e, quindi, di indurre le stesse attività biologiche. I recettori di membrana appartengono alla superfamiglia delle Ig. Il recettore di tipo I (IL-1RI) è espresso su quasi tutti i tipi cellulari ed è responsabile delle azioni di IL1; il loro legame induce l'attivazione di una chinasi detta IRAK (chinasi associata al recettore per IL1) che attiva NF- κ B e AP-1. Il recettore IL-1 RII è principalmente espresso sulla superficie dei linfociti B e la sua sintesi può comunque essere indotta in altri tipi cellulari. La sua attivazione non porta a trasduzione del segnale nella cellula ma esso si comporta come un recettore decoy ossia un falso bersaglio che lega IL-1 competendo , quindi, con il recettore IL 1R biologicamente attivo per il legame alla citochina. Le funzioni della IL1 a livello delle cellule endoteliali sono: induzione dell'infiammazione e coagulazione mentre a livello ipotalamico sono in grado di indurre febbre e nel fegato inducono la sintesi di proteine di fase acuta. I macrofagi sintetizzano un inibitore strutturalmente simile a IL-1 e quindi in grado di legarsi al recettore IL- 1R ma senza attivarlo , così da agire da inibitore competitivo: la molecola è stata chiamata IL -1ra perché si comporta da antagonista del recettore e quindi è un suo modulatore endogeno. A livello del follicolo pilifero è coinvolto nella regolazione della crescita del capello ed è stato evidenziato come in colture cellulari di follicoli inibisce la crescita delle fibre del capello e porta ad alterazioni morfologiche simili a quelle evidenziate nell' AA.

IFN γ : è il principale responsabile della risposta immunità innata ma svolge importanti funzioni anche nella risposte cellulo-mediate. È prodotta dalle cellule NK, dai linfociti CD8+ e CD4+di cui ne rappresenta il principale induttore(57, 58). Le cellule NK producono IFN γ in risposta a IL 12 o a componenti microbiche non ancora identificate mentre i linfociti lo producono in risposta al riconoscimento dell'

antigene e questo effetto può essere potenziato da IL -12 e IL -18. Il recettore dell' IFN γ è composto da due catene polipeptidiche strutturalmente omologhe appartenenti alla famiglia del recettore per le citochine di tipo II: una catena lega la citochina mentre l'altra trasduce il segnale che consiste nell'attivazione di STAT1 il quale stimola a sua volta la trascrizione dei geni responsivi per IFN γ tra i quali figurano le molecole MHC, le molecole costimolatorie B7, gli enzimi preposti alla sintesi di sostanze microbicide ed altre citochine. Sintetizzando, quindi, l' IFN γ è la citochina attivatrice dei macrofagi e rappresenta il mezzo con cui i linfociti T e le cellule NK attivano i meccanismi battericidi attraverso la stimolazione della sintesi della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico e l'ossidasi. Stimola, inoltre, l'espressione da parte delle APC delle molecole MHC di classe I e II e di molecole costimolatorie e nelle APC stimola la produzione di proteine coinvolte nel processamento dell'antigene come il TAP, i componenti del proteasoma e le molecole HLA-DM facilitando, quindi, il processo di presentazione dell'antigene in associazione a MHC e amplificando la risposta immunitaria in seguito all'aumento dell'espressione dei ligandi riconosciuti dai linfociti T. Esso promuove, inoltre, la differenziazione dei linfociti T CD4⁺ naive in cellule Th1 sia in modo indiretto, attraverso la stimolazione della produzione di IL 12, sia in modo diretto attraverso la sintesi di un fattore di trascrizione detto T-bet ; per quanto riguarda i Th2 ne inibisce la proliferazione. Nel follicolo pilifero è, quindi, responsabile della risposta CD4⁺ mediata dei T helper ed è sintetizzata dall'APC follicolare e perifollicolare attraverso diversi meccanismi che sopprimono l'abilità delle cellule della papilla dermica di mantenere la crescita del follicolo e quindi la fase anagen.

Alti livelli sono stati osservati in pz con AA totale o universale.esso induce anche la sintesi di MIG , una citochina elevata nell' AA e marker utile nel monitoraggio della malattia.è espressa soprattutto nelle cellule mononucleari nell' ifiltrato peri e intrabulbare e anche nella papilla follicolare. un altro fattore è IP 10 una chemochina che induce il reclutamento di c mononucleari nell' AA

È stato dimostrato che l' attivazione di entrambi i recettori è necessaria per l' attivazione della trascrizione dei geni indotti da IFN γ (59) mentre l' espressione soltanto di IFN γ R α è sufficiente per il legame dei ligandi. Mentre l' IFN γ R α nei cheratinociti epidermici è up regolato in vitro dall' incubazione con IFN γ , esso non ha effetti sull' espressione dei livelli di IFN γ R β . Ito e Paus nel 2005 hanno condotto uno studio sul ruolo di IFN γ nella modulazione della crescita, della pigmentazione e/o del ciclo di follicoli messi a coltura dopo aver sviluppato un sistema in vitro utile a spiegare cosa accade realmente in vivo, inoltre, in questo stesso studio hanno proceduto alla localizzazione dei recettori per IFN γ sia in anagen che in catagen. In anagen il follicolo esprime IFN γ R α nella matrice del capello e nella guaina esterna della radice prossimale; l' IFN γ R β è espresso, in modo importante, nella guaina esterna della radice prossimale mentre la matrice del capello e la papilla dermica mostrano una scarsa immunoreattività per questo recettore. L' epidermide e la guaina esterna della radice distale hanno una positività per il recettore β solo nello strato basale. In catagen il follicolo esprime una grande immunoreattività per il recettore β nella matrice, nella papilla dermica e la guaina esterna della radice prossimale. La crescita e la pigmentazione sono state misurate attraverso l' istomorfometria quantitativa supportata da altri metodi per valutare a livello follicolare i cambiamenti dei parametri precedentemente esposti. I risultati di

questo studio sono stati molto importanti nell' identificazione del ruolo di IFN γ il quale sembra inibire la crescita nei follicoli umani in anagen in coltura ed è in grado di indurre gli evidenti segni morfologici della trasformazione in fase catagen in modo molto più rapido degli altri induttori di catagen come, ad esempio, TGF β 2. Esso inoltre inibisce la proliferazione, aumenta l' apoptosi e la melanogenesi follicolare ed è spento nei bulbi i cui cheratinociti erano stati trattati in situ con IFN γ . L' immunoreattività per TGF β 2 e i livelli di trascrizione di mRNA sono potenziati nei follicoli trattati con IFN γ e perciò è plausibile ritenere che l' up regolazione del TGF β 2, che è il più importante fattore stimolatore della fase catagen, sia alla base dell' induzione di questa fase del ciclo del capello.

4.NEUROPEPTIDI

Prodotti e rilasciati dalle terminazioni nervose cutanee i neuro peptidi sono in grado di determinare la modulazione della risposta infiammatoria cutanea e mettono in evidenza connessioni tra sistema nervoso, cute e sistema immunitario. La sostanza P e VIP, infatti, inducono la degranolazione delle mast cellule (60,61). Il rilascio dei neuropeptidi porta, dunque, alla degranolazione delle mast-cellule che liberano TNF α e IL 10 le quali hanno un effetto immunosoppressore legato all' inibizione di CD86 (molecola co-stimolatoria): inibendo l' espressione delle molecole co -stimolatorie e degli MHC da parte di macrofagi e cellule dendritiche si inibisce l' attivazione dei linfociti T quindi si pone fine all' attivazione di risposte immunitarie cellule mediate. Degna di nota per le numerose implicazioni future di ricerca è l' azione di CGRP

(Calcitonin gene-related peptide) che, oltre a modulare l' infiammazione cutanea, è in grado di indurre vasodilatazione e melanizzazione tramite l' interazione con i fattori cheratinocitari.

Il CGRP è co-espresso con la sostanza P nelle fibre sensitive intra-cutanee ed fondamentale è la sua funzione immuno-modulatoria perché presenta funzioni pro ed anti-infiammatorie : per esempio nel topo CGRP migliora il processo distruttivo a carico delle beta cellule e diminuisce la comparsa di diabete mentre nella cute può inibire la funzione delle cellule di Langerhans intraepidermiche ed inoltre potrebbe essere coinvolto nell' immunosoppressione indotta da UV. Nella trasduzione del segnale è fondamentale la presenza del recettore per CGRP (CRLR): esso è distribuito nel capello (guaina esterna) e nell' endotelio arterioso, venoso e capillare dermico e l' effetto finale della segnalazione ha notevoli interazioni con la secrezione di IFN γ e quindi è fondamentale nella modulazione dell' espressione di MHC. Studi immunomorfometrici in cui è stata valutata l' immunoreattività per CRLR hanno dimostrato non solo la localizzazione del recettore (guaina esterna, venule e capillari della papilla) ma hanno reso possibile evidenziare gli effetti del legame di CGRP in relazione al mantenimento del privilegio immunologico. È importante indagare i fattori implicati nel mantenimento di questa funzione e il loro rapporto in relazione alla capacità di proteggere e/o ristabilire le proprietà del follicolo pilifero e del privilegio immunologico. Sono stati, dunque, allestiti due saggi in cui a follicoli piliferi normali sono stati aggiunti CGRP e IFN γ in sequenze cronologiche diverse; in seguito è stata valutata la risposta immunitaria al fine di rilevare, attraverso esami immunomorfometrici, evidenze a favore delle capacità di ripristino e di protezione del CGRP.

L'effetto protettivo di CGRP, inoltre, è evidenziato da studi condotti senza l'induzione della perdita del privilegio immunologico in cui CGRP attenua significativamente l'up regulation della degranolazione delle mast cellule del tessuto connettivo indotta da IFN γ . È evidente come CGRP sia in grado proteggere e quindi mantenere il privilegio immunologico mentre non è in grado di ripristinarlo in seguito ad un insulto, di natura immunologica, in grado di comprometterlo. Il probabile indirizzo che intraprenderanno gli studi futuri sarà orientato verso una maggiore conoscenza dei meccanismi molecolari con cui CGRP induce questa "vigilanza" nei confronti del privilegio immunologico. È già possibile ipotizzare un eventuale meccanismo di azione attraverso il parallelismo con un altro sito in cui è stato possibile rilevare CGRP: l'umore acqueo. Esso è una struttura anatomico-funzionale caratterizzata dalla presenza di privilegio immunologico. Nell'umor acqueo è stato evidenziato il meccanismo di azione del CGRP che avviene con la soppressione della produzione dell'ossido nitrico (NO) mediata dai macrofagi attivati i quali agiscono attraverso l'inibizione dell'attività enzimatica del NOS 2 (NO sintetasi 2).

NATURAL KILLER: STRUTTURE E FUNZIONI

Le cellule NK sono una sottopopolazione di linfociti in grado di uccidere le cellule infette e le cellule che hanno perso l'espressione delle molecole MHC I, la capacità di produrre citochine e in modo particolare IFN γ . Esse derivano da precursori midollari e sono costituiti da grossi granuli citoplasmatici e sono in grado di uccidere

i tipi cellulari precedentemente elencati senza necessità di attivazione diversamente dai linfociti T CD 8+ che devono essere attivati prima della differenziazione in linfociti T citotossici (CTL). L' attivazione delle cellule NK è regolata da un bilanciamento di segnali generati da recettori attivatori ed inibitori. Questi recettori appartengono a numerose famiglie e sono costituiti da domini coinvolti nel riconoscimento del ligando e domini coinvolti nella trasduzione del segnale. Le cellule che devono essere eliminate dai NK esprimono sulla loro superficie dei ligandi specifici che legano recettori attivatori. I recettori inibitori, invece, legano le MHC I espresse dalla maggior parte delle cellule normali. Quando i recettori inibitori sono occupati la cellula NK non viene attivata: è questo meccanismo a proteggere le cellule normali dall' uccisione da parte delle cellule NK. Diversamente accade quando nella cellula si ha un' inibizione dell' espressione delle molecole MHC I e , quindi, si perde il legame tra recettore inibitori e ligandi: le cellule NK vengono attivate e i recettori di attivazione vengono a legarsi con i specifici ligandi attivatori favorendo l' uccisione delle cellule infettate.

I recettori attivatori hanno molecole di segnale con caratteristici motivi di attivazione ITAM nelle loro code citoplasmatiche che si servono di tirosin chinasi proteiche (SYP e ZAP-70) e proteine adattatrici per attivare i geni e adattare il citoscheletro analogamente ai linfociti T e B che si servono delle stesse strutture molecolari per l' attivazione del segnale in seguito al riconoscimento dell' antigene. Essi comprendono gruppi strutturalmente distinti di molecole per i quali sono noti solo alcuni ligandi: tra questi vanno menzionati CD16 (recettore Fc delle IgG a bassa affinità associato con FcεRIγ e proteine ζ) responsabile della citotossicità anticorpo dipendente e NKp46, Nkp30 e NK p44 (recettori della citotossicità naturale).

I recettori inibitori, invece, possiedono i recettori inibitori ITIM che vengono fosforilati a livello dei residui tirosinici e legano tirosin fosfatasi che defosforilano le molecole coinvolte nella trasduzione del segnale. I recettori inibitori sono divisi in tre principali famiglie. La prima ad essere stata scoperta è la famiglia dei recettori killer Ig-like (KIR), così chiamata perché i suoi membri contengono due o tre domini extracellulari Ig-simili. I KIR riconoscono differenti alleli delle molecole HLA-A,-B,-C. Studi strutturali e di legame indicano che per il riconoscimento da parte del KIR è importante la sequenza dei peptidi legati alle molecole MHC. Il legame delle molecole HLA ai KIR è caratterizzato da una grande rapidità di attivazione e spegnimento che potrebbe servire alle cellule NK per testare la presenza di MHC in molte cellule. Alcuni membri della famiglia dei KIR hanno code citoplasmatiche corte senza ITIM che fungono da recettori attivatori e si differenziano dai recettori inibitori caratterizzati dalla presenza di ITIM e da code citoplasmatiche lunghe. Una seconda famiglia di recettori inibitori consiste in trascritti Ig-like (ILT) che contengono anch'essi domini Ig simili. La terza famiglia è costituita da eterodimeri composta da lectine di tipo C NKG2A e NKG2B legate in modo covalente al CD 94. NKG2A e NKG2B hanno due motivi ITIM nelle loro code citoplasmatiche ma alcuni recettori non li possiedono e fungono da recettori attivatori delle NK. I recettori CD 94/ NKG2 legano HLA-E, una molecola MHC non classica la cui espressione stabile sulla superficie cellulare dipende dal legame di peptidi segnale che derivano da HLA-A, -B, -C o -G. Essi assolvono una funzione fondamentale nel controllo dell'assenza di HLA -E, di MHC di I tipo e delle molecole HLA-G. Come precedentemente menzionato alcuni recettori inibitori, i KIR, hanno code citoplasmatiche corte senza ITIM che fungono da recettori attivatori. È noto che questi recettori riconoscono

molecole MHC di I classe e non è chiaro perché sulle cellule NK si trovino tali molecole potenzialmente dannose. Esse legano MHC con un' affinità più bassa rispetto a quelli inibitori e probabilmente legano molecole MHC correlate legate a condizioni patologiche. Questo è il caso di NKG2D espresso sulle cellule NK e sui linfociti T ed è correlato alle NKG2. NKG2D si associa ad una molecola che contiene nella coda citoplasmatica un dominio in grado di legare le chinasi piuttosto che un motivo ITAM. Questo recettore riconosce le molecole MICA, MICB e ULBP ognuna delle quali è codificata nell' MHC, ha domini omologhi ai domini α e β di classe I MHC, ma non lega peptidi e non si lega a $\beta 2$ microglobulina. Questi ligandi di NKG2 non sono espressi in quantità rilevante sulle cellule normali ma sono up-regolati dallo stress e frequentemente si trovano nelle cellule neoplastiche. Un' altra modalità di attivazione delle cellule NK è attraverso il recettore a bassa affinità per la porzione Fc delle immunoglobuline IgG1 e IgG3 (Fc γ RIIIa) che permette alle NK di riconoscere le cellule bersaglio ricoperte di anticorpi e quindi di ucciderlo attraverso questo specifico processo chiamato citotossicità cellulo -mediata anticorpo – dipendente. L' espressione e le attività delle cellule NK sono stimulate da citochine quali IL -15 e IL -12 prodotte dai macrofagi. L' IL- 18 può esaltare l' attività di IL -12 ed entrambi sono in grado di stimolare la produzione di IFN γ da parte dei linfociti T con conseguente attivazione dei macrofagi fondamentali nell' immunità innata e specifica. Anche gli IFN di I tipo (IFN α e IFN β) attivano il potenziale citotossico delle cellule NK probabilmente aumentando l' espressione dei recettori per IL-12 e quindi aumentando la capacità di rispondere a questa citochina.

Le funzioni delle cellule NK consistono nell' uccisione delle cellule infettate e nell' attivazione dei macrofagi al fine di distruggere i microbi fagocitati con un

meccanismo basato sulla citotossicità essenzialmente identico a quello dei CTL. Entrambi i tipi cellulari infatti possiedono granuli che contengono una proteina, la perforina, capace di creare fori sulle membrane delle cellule bersaglio ed enzimi, granzimi, che penetrano attraverso la membrana e inducono apoptosi. L'uccisione delle cellule mediata da NK, quindi, è rivolta non solo alle cellule infettate da batteri o virus ma anche alle cellule tumorali di derivazione ematopoietica probabilmente perché queste strutture sono caratterizzate da un tipo anomalo di molecole MHC di I tipo o non le esprimono. È importante sottolineare che le cellule NK possono uccidere cellule infettate le quali sfuggono alla risposta dei CTL attraverso la riduzione dell'espressione delle molecole MHC di I classe.

Analogamente ai CTL l' IFN γ prodotto dalle cellule NK è in grado di attivare i macrofagi e quindi di uccidere i microrganismi da essi fagocitati. Altra importante funzione è la capacità di distinguere i bersagli potenzialmente pericolosi dal self e questo dipende dall'espressione dei recettori inibitori e attivatori precedentemente elencati. Nello studio del privilegio immunologico e della biologia del follicolo pilifero i NK sono, quindi, importanti nella conoscenza della discriminazione tra self e non self e nella conoscenza del mantenimento del privilegio immunologico. Nel follicolo in anagen le cellule NK sono localizzate in scarsissimo numero nella zona perifollicolare. La protezione delle cellule negative per MHC di I tipo è possibile grazie ai seguenti meccanismi (62, 63):

- Bassa espressione di MICA nel follicolo
- Bassa espressione di NKG2D sulle cellule NK
- Espressione di KIR sulle cellule NK

COSTIMOLAZIONE: COMPONENTI, FUNZIONI E MECCANISMI.

Le molecole costimolatorie sono fondamentali per attivare i linfociti T ma perché ciò avvenga sono necessari due diversi tipi di segnale: il primo segnale si basa sul riconoscimento dell' antigene e il secondo si basa, appunto, sulla presenza di molecole costimolatorie (64). Il linfocita, dunque, deve dapprima riconoscere l' antigene che si viene a localizzare sulla superficie di una APC e questo processo è fondamentale per indurre l' aggregazione dei TCR (T Cell Receptor) e dei corecettori (CD4 o CD8) al complesso peptide-MHC e determinare , quindi, la segnalazione tramite vie di trasduzione che portano all' attivazione di fattori trascrizionali coinvolti nella trascrizione di numerosi geni. La sola aggregazione del TCR con il complesso peptide-MHC espresso sull' APC non è sufficiente, però, ad indurre la risposta immunitaria T mediata; fondamentale è il ruolo delle molecole costimolatorie, espresse dalle APC, che fungono da secondo segnale. Esse assumono un compito importantissimo nell' attivazione dei linfociti T e quindi nella discriminazione tra self e non self o nel riconoscimento di molecole estranee all' organismo verso cui scatenare la risposta immunitaria. Esse sono necessarie perché questi processi si svolgano correttamente ed è infatti dimostrato che l' assenza di molecole costimolatorie conduce o all' anergia o all' apoptosi delle cellule T. A tale proposito l' espressione delle molecole costimolatorie è finemente regolata; è aumentata da prodotti microbici e da citochine come l' IFN γ e dal legame di CD40 – CD40L. Il CD40 è espresso sulla superficie delle APC ed è in grado di indurre, in seguito al riconoscimento del complesso dell' APC da parte del TCR, l' espressione

del CD40L nel linfocita. Il legame di queste due strutture determina sia l'espressione di B7-CD28 sia la secrezione di citochine che attivano i linfociti T.

Le molecole costimolatorie meglio caratterizzate sono le proteine B7 ma, per il loro importante ruolo nella patogenesi di molte malattie, altre classi sono in studio e tra queste le più importanti sono TNF e TIM.

- B7 - CD28

Come precedentemente esposto, CD28 è una proteina di membrana che trasduce segnali complementari a quelli del TCR nell'attivazione del linfocita T naive. Il CD28 è espresso da circa il 90 % dei linfociti T CD4+ e dal 50 % dei CD8+ e strutturalmente è un omodimero costituito da due catene dotate di domini Ig. Il CD28 lega le proteine B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) espresse dalle APC attivate mentre sono assenti nelle APC quiescenti. Le proteine B7 sono glicoproteine a singola catena, strutturalmente simili tra di loro, costituite da due domini extracellulari di tipo Ig, da un segmento transmembrana e da una coda citoplasmatica. La funzione di queste due molecole è fondamentale, come detto, nell'attivazione dei linfociti T naive ma è altrettanto importante nel determinare il corretto sviluppo e funzionamento delle cellule T regolatorie (Treg). Le cellule Treg (CD25+CD4+) sono un insieme soppressivo di cellule T che costituiscono circa il 10% delle cellule CD4+. La maggior parte di esse provengono dal timo ma alcune possono essere indotte in periferia come dimostrato, nel 2008, da Sakughi (65). Esse esprimono in maniera specifica il fattore di trascrizione Foxp3 (forkhead box P3), un fattore di trascrizione membro della famiglia dei fattori a forcina che legano la doppia elica del DNA. Foxp3 è il maggior regolatore dello sviluppo e della funzione delle Treg e la sua funzione

specifica è quella di sopprimere le risposte immunitarie. La riduzione di Foxp3 determina il deficit di Treg o la loro disfunzione ed è responsabile di disordini autoimmuni osservati in un complesso quadro nosologico come la IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) Foxp3 è importante perché regola l' espressione di numerosi geni fondamentali per lo svolgimento della corretta funzione delle cellule Treg come: IL2, CD25, CTLA4. È, ormai, chiaro da tempo come le cellule Treg siano di importanza critica nel mantenimento della tolleranza al self e nella tutela dell' omeostasi immunitaria ma resta da stabilire come queste cellule svolgano queste funzioni e quali siano i meccanismi alla base dei processi immunitari in cui esse sono coinvolte. CTLA-4 e IL-2 sono rispettivamente attivati o repressi da Foxp3: sono proprio queste due strutture ad essere probabilmente implicate nella regolazione dei meccanismi alla base dell' espressione delle cellule Treg. Alla luce delle evidenze precedentemente descritte risulta che la funzione di CD28 è duale: esso possiede una funzione stimolatoria in grado di promuovere la risposta T mediata contro i microrganismi e, allo stesso tempo, è caratterizzato da una funzione inibitoria che mette in atto meccanismi regolatori richiesti per terminare la risposta immunitaria al fine di prevenire l' autoimmunità. Le molecole costimolatorie sono state identificate inizialmente per la loro funzione stimolatoria ma è evidente la loro importanza nell' esercitare una funzione inibitoria. È proprio ai fini della conoscenza di questa funzione che si stanno concentrando gli ultimi studi: essi mirano alla conoscenza della morfologia e delle funzioni delle molecole alla base di questo importante meccanismo. Il primo esempio ben caratterizzato di un recettore

inibitorio presente sulle cellule T è CTLA-4. Esso è strutturalmente omologo a CD28 e costituisce un secondo recettore per B7-1 e B7-2.

- CTLA 4

È un recettore omologo a CD28 che lega B7 ed è espresso dai linfociti CD4 e CD8 recentemente attivati. La sua funzione è inibire l'attivazione dei linfociti T contrastando, quindi, l'azione di CD28. Esso è espresso dai linfociti T attivati ma anche dai Treg e lega, competendo con il recettore stimolatorio CD28 ad esso prossimo, le molecole CD80 e CD86 espresse sulla superficie delle APC (66, 67). È particolare il fatto che gli stessi ligandi, a seconda del recettore a cui sono associati, esplicano funzioni diverse infatti se sono associati al recettore CD28 sono in grado di generare un segnale attivatorio mentre se legati al CTLA4 attivano un segnale inibitorio. Il polimorfismo del gene di CTLA4 contribuisce alla suscettibilità genetica delle malattie autoimmuni come accade nel caso del diabete mellito di tipo1. I linfociti Treg Foxp3⁺ sono caratterizzati dall'espressione costitutiva del CTLA4, che avviene solo dopo l'attivazione in altri sottoinsiemi di cellule T, la cui espressione è controllata proprio da Foxp3. Le evidenze a favore dell'importanza del CTLA4 nel controllo inibitorio derivano da studi condotti da Wing nel 2008 che hanno dimostrato come la mancanza di CTLA 4 nei Treg di topi knock out per il gene di Foxp3 porti allo sviluppo di proliferazione linfatica sistemica, malattie autoimmuni, iperproduzione di IgE ed immunità tumorale. La perdita delle funzioni immunosoppressive di Treg è legata all'alterazione di CTLA4 che conduce alla down-regolazione dell'espressione di CD80 e CD86 nelle cellule dendritiche. CTLA4 è un recettore co-inibitorio che ha una funzione estrinseca nella soppressione

immunitaria e che trasduce un segnale negativo dentro una cellula T attivata in grado di attenuare sia TCR sia CD28. In supporto di questa idea c'è l'evidenza che il legame di CTLA4 da parte di anticorpi specifici su una cellula T attivata inibisce la produzione di IL 2 una citochina richiesta per la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza. Tuttavia CTLA4 potrebbe avere una funzione estrinseca nella soppressione immunitaria: il CTLA-4 espresso da cellule T attivate e Treg smorza l'espressione di CD80 e CD86 da parte delle APC. Il funzionamento di CTLA4 è basato, come dimostrato da Qureshi (68), su un meccanismo di trans-endocitosi e degradazione di CD80 o CD86 dalla superficie delle APC. L'autore ha dimostrato che cellule T attivate esprimenti CTLA4 messe a coltura con cellule dendritiche (esprimenti CD86) rimuovono, attraverso un meccanismo di endocitosi, il complesso costituito dalla molecola delle APC (CD86) legata al CTLA4 delle cellule T. Le molecole così rimosse sono rapidamente degradate nel citoplasma. Questo meccanismo è stato ulteriormente confermato dallo studio in vivo in cui la somministrazione di antigeni promuove l'endocitosi di CD86 nelle cellule Treg normali esprimenti il CTLA4 mentre le Treg prive di CTLA4 non sono in grado di effettuare questo processo. Oltre al suo ruolo in endocitosi CTLA4 può semplicemente competere con CD28 per il legame al CD80 o CD86 nella sinapsi immunologica a causa della sua più alta capacità di legame per questi ligandi e a causa della sua aumentata espressione al momento della stimolazione dei TCR (69). CTLA4 potrebbe, inoltre, tradurre i segnali attraverso CD80 e CD86 all'interno delle APC e indurre la loro produzione di un metabolita immunosoppressivo, reprimere la trascrizione dei geni codificanti per CD80 e Cd86 o inibire la produzione di citochine

infiammatorie anche se resta da definire come le cellule T mettano in atto, attraverso CTLA4, questi meccanismi nelle APC (70).

- MOLECOLE INIBITORIE: ICOS, PD-1, BTLA.

Dallo studio della famiglia B7-CD28 è nata la conoscenza dei segnali inibitori che svolgono un ruolo importantissimo nel controllo dei rapporti tra le cellule Treg e le cellule T effettrici. Le molecole appartenenti a questa nuova famiglia di B7 sono: ICOS ligando (B7h, GL50, B7RP-1, LICOS, and B7-H2), PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B7-DC), B7-H3 e B7-H4 (B7x / B7-S1), B7S3, e BTNL2. Essi sono espressi non solo dalle APC ma anche dalle cellule non ematopoietiche e quest' ultima caratteristica suggerisce che essi potrebbero funzionare come attivatori delle cellule T e/o come regolatori della tolleranza negli organi non linfoidi.

La via ICOS / ICOS ligando ha un ruolo critico nella stimolazione della risposta delle cellule T effettrici, nella risposta T dipendente delle cellule B e nel controllo dei rapporti tra le T reg e i T effettori nonché nelle risposte attuate da un nuovo tipo di Th, tuttora in fase di studio, i Th17, responsabili del controllo delle risposte autoimmunitarie. ICOS è espressa in modo esclusivo nelle cellule T attivate ed ha un unico ligando: ICOS-L. La sua espressione nelle cellule T non è costitutiva (quindi è assente nelle cellule T naive) ma è inducibile ed è , a tale proposito, rilevato solo nelle cellule T attivate. Esso è codificato, nell' umano, nel cromosoma 2q33-34 in una regione lunga 300kb in stretta prossimità ai geni per CTLA4 e CD28.

La sua espressione non dipende solamente da CD28; dati sui topi indicano che IL-4 stimola l' espressione di ICOS e sia Th1 che Th2 esprimono ICOS all' attivazione ma solo nei Th2 persiste ad alti livelli. Dati sull' uomo sono relativamente scarsi

sebbene uno studio mostri che IL-12 e IL-23 piuttosto che IL-4 attivano l'espressione di ICOS. Anche ICOS, come CD28, in fase precoce ha un ruolo importante nell'attivazione dei linfociti T mediante segnali di natura stimolatoria che sono principalmente di tipo citochinico. Nella fase di attivazione tardiva esso è fondamentale nella messa a punto finale delle funzioni delle cellule T effettrici e quindi si può concludere che, a questo livello di attivazione, ICOS innesca le risposte immunitarie e controlla le risposte autoimmuni. Volendo elencare le funzioni di ICOS è coinvolto nella generazione del recettore 5 delle chemochine (CXCR5) delle cellule T helper follicolari (THF), un insieme di cellule T che regola le reazioni del centro germinale e l'immunità umorale. I THF vengono regolati dalla secrezione di IL-21 la cui produzione è regolata, a sua volta, da ICOS e che, oltre ad influenzare l'attività del centro follicolare, influenza le cellule Th17. Il Thf non esprime citochine di natura Th2 come IL4, IL5 e IL10 ma esprime IL21, fondamentale per la maturazione delle cellule B e per la regolazione dell'espressione dell'IL17. Le molecole IL17, IL21, T CD4+ e Th17 sono in stretto contatto tra di loro ed ognuna di esse è funzionale per il corretto svolgimento delle funzioni delle molecole precedentemente elencate. IL 21 è espressa, oltre che dalle cellule del Thf stimulate da ICOS, anche dai linfociti Th17 che possono sintetizzarla solo dopo un'opportuna costimolazione con ICOS. Le cellule Th17, così stimulate, producono IL17 la cui espressione è controllata dai livelli di IL21. Inoltre anche l'IL21 è prodotta dai Th17 e in associazione col TGF β ne promuove la differenziazione. Da non trascurare è il ruolo che ICOS assume nella produzione di IL-10 da parte delle cellule Treg e quindi, esso, assume una funzione di controllo nell'ambito della tolleranza periferica. ICOS è impegnato nella costimolazione della produzione dell'IL 10 questa importante

implicazione è stata confermata da un lavoro di Lohning (71) del 2003. In esso l'autore dimostrava come i livelli di espressione di ICOS nelle cellule T CD4+ correlassero con il tipo di citochine da esse prodotte. A medi livelli di espressione di ICOS i linfociti TCD4+ esprimevano citochine prodotte dalle cellule Th2 come ad esempio IL4, IL5 e IL13 mentre le cellule esprimenti alti livelli di ICOS producevano IL10. A causa dell'importanza di ICOS nella regolazione della produzione delle cellule Treg numerosi studi sono stati effettuati per correlare l'espressione di queste molecole con le implicazioni cliniche a cui sono correlate come la regolazione dell'iper-reattività delle vie aeree, l'induzione della tolleranza orale e nasale, la regolazione della tolleranza mucosale e l'insorgenza del diabete mellito. Questi studi sottolineano come è possibile che la funzione delle cellule Treg e quindi lo sviluppo di malattie autoimmuni, qualora questa venisse alterata, può essere controllata con un meccanismo strettamente dipendente da ICOS. Ulteriori conferme del ruolo di ICOS nella regolazione delle funzioni delle cellule Treg derivano da studi effettuati da Grimbacher e colleghi che nel 2009 hanno valutato le mutazioni di ICOS in pazienti affetti da common variable immunodeficiency (CVID) una immunodeficienza primaria complessa ed altamente eterogenea che si estrinseca nel deficit di anticorpi e che è la più comune malattia da immunodeficienza sintomatica. È definita da una riduzione delle IgG e dall'incapacità di mettere in atto una risposta anticorpale sia verso i vaccini che verso gli agenti microbici. I risultati di questi studi evidenziavano come l'assenza di ICOS conduce al deficit di produzione di IL10 e IL17, all'alterata maturazione nel centro germinale e allo switch di classe isotipico che, conducono, appunto, alla comparsa di ipogammaglobulinemia. Nelle Treg esiste un sottoinsieme ICOS+ e un altro ICOS-.

Il primo sopprime la funzione delle cellule dendritiche attraverso l' IL-10 e la funzione delle T cellule attraverso il TGF β ; essi sono dipendenti dalla stimolazione con ICOS-L per la sopravvivenza e la proliferazione nelle colture e la stimolazione con anti- CD28 ne inibisce la proliferazione. Il secondo sottoinsieme invece non è stato predisposto all' apoptosi e prolifera in presenza del segnale anti CD-28. Infatti in essi ICOS regola la produzione di IL 21 che regola l' espansione dei Th17 e TFH.

Ai fini della comprensione del ruolo di ICOS bisogna , inoltre, analizzare la sua collaborazione con il recettore costimolatorio più diffuso nelle cellule T: il CD28. I topi che non hanno CD28 o i suoi ligandi sono compromessi nella proliferazione delle cellule T CD4. In questi topi, quindi, livelli ridotti di citochine effettrici sono ancora prodotti. L' analisi dei topi deficienti in ICOS o i suoi ligandi hanno rivelato che questa via regola la loro funzione effettrice selettiva. Per capire nel migliore dei modi la regolazione dell' autoimmunità e della tolleranza sono state studiate sia il ruolo delle molecole costimolatorie che di quelle inibitorie. Le cellule attivate senza CD28 e ICOS sono bloccate nella proliferazione ed effettuano approssimativamente due o tre divisioni, comunque le cellule T specifiche per un antigene in assenza delle molecole costimolatorie potrebbe upregolare i marker attivatori, sopravvive oltre il tempo e potrebbe avere le caratteristiche delle cellule anergiche, iporesponsive alla ri-stimolazione con TCR/CD3. Le caratterizzazioni biochimiche rivelano che queste cellule erano diminuite nella trasduzione di TCR che porta alla trascrizione genetica attraverso l' inibizione dell' attivazione di MAP chinasi, NFAT e NF- κ B. Inoltre è ridotta in modo importante l' espressione di due componenti critici nella trasmissione del segnale mediata da TCR come PKC θ e PLC γ 1. Essi sono stati recentemente identificati come le molecole target dell'

apparato di degradazione regolato dall' ubiquitina che è in grado di indurre anergia cellulare e perciò in queste cellule è elevata l' espressione di due ligasi E3 per l' ubiquitina come cbl-b e Itch. Più sorprendentemente sia CD4 che CD8, dopo l' attivazione con CD28 e ICOS, esprimono Grail, una ligasi dell' ubiquitina E3, in cui era stato precedentemente evidenziato che l' espressione era associata con l' anergia delle CD4 in vivo e in vitro. Inoltre questi CD4 e CD8 condividono delle caratteristiche con le cellule anergiche Th1. In un modo ancor più interessante l' analisi della funzione delle cellule T effettrici rivela che l' attivazione delle T naive CD4+ e CD8+ senza attivazione mediata da CD28 e ICOS blocca del tutto la loro funzione effettrice. Le cellule anergiche CD4 non producono nessuna citochina effettrice in seguito a ristimolazione, mentre le cellule CD4 attivate senza B7 o ICOS producono bassi ma comunque rintracciabili livelli di citochine effettrici. Le cellule CD8+ anergiche non esprimono né citochine né enzimi citolitici e, quindi, potrebbero non svolgere la loro funzione di uccisione delle cellule target. Le cellule espresse in assenza di costimolatori positivi sono alterate nell' espressione dei fattori trascrizionali (T-bet e GATA3 per cellule T CD4+; T-bet e Eomes per cellule T CD8+) i quali regolano la differenziazione delle cellule effettrici e la produzione di citochine. PMA/ionomycin potrebbe ristabilire la proliferazione ma non l' espressione citochinica nelle cellule anergiche. Questi risultati indicano che l' impedimento globale nella funzione effettrice nelle cellule tolleranti non era dovuto solo ai segnali difettosi del TCR ma piuttosto a un' assenza intrinseca del programma dell' espressione di un gene effetttore. Così, quando le T naive sono attivate in assenza di CD28 e ICOS, invece di differenziare in cellule effettrici sembrano evolvere in T cellule tolleranti sia con il TCR che con i difetti di

trascrizione genetica. L' assenza di B7 o ICOS risulta solo nelle funzioni immunitarie alterate ma non è stata osservata un' assoluta tolleranza delle Tcellule..

LE CELLULE Treg: FUNZIONI E MECCANISMI.

Per mantenere la tolleranza al self e l' omeostasi immunitaria ci sono due meccanismi cellulari: il recessivo e il dominante. Nel primo caso il destino dei linfociti autoreattivi esposti all' antigene è determinato da un meccanismo cellulare intrinseco(72). Per esempio alcuni linfociti sono programmati a morire per apoptosi quando sono esposti all' autoantigene in uno stadio immaturo del loro sviluppo negli organi centrali (timo per le cellule T e midollo osseo per le cellule B) mentre altri linfociti rimpiazzano i recettori autoreattivi delle cellule T e B (TCR e BCR) con recettori non reattivi con un processo chiamato editing del recettore. I linfociti che sono sfuggiti all' eliminazione clonale e all' editing possono maturare ulteriormente ma possono diventare anergici quando esposti all' auto antigene. Inoltre la soglia di attivazione può essere aumentata dall'espressione dei recettori inibitori o dei segnali negativi e le cellule potrebbero non sopravvivere a causa dell' apoptosi. Il controllo intrinseco del destino cellulare o della soglia di attivazione inoltre contribuisce all' inibizione dell' eccessiva risposta agli antigeni non self. Nel meccanismo dominante o cellulare estrinseco alcune cellule T tengono attivamente sotto controllo l' attivazione e l' espansione di linfociti aberranti o ipereattivi: è proprio in questa funzione che intervengono i Treg. Ogni risposta di tipo adattativo coinvolge il reclutamento e l' attivazione delle cellule T, delle cellule B ma anche

delle cellule Treg perciò la regolazione dei meccanismi di regolazione tra queste strutture è critica ai fini del controllo della qualità e dell'importanza della risposta immunitaria. Alla luce delle evidenze concernenti la funzione di Treg è possibile formulare molte nozioni chiave per quanto riguarda lo sviluppo della tolleranza al self e la regolazione immunitaria. Come primo aspetto importante esse sono coinvolte nella risposta verso cellule self, verso cellule tumorali (quasi autologhe) e non self (microbi e strutture esterne), in secondo luogo esse persistono a livello periferico al fine di eliminare le cellule autoreattive che, eventualmente, vengono prodotte nel timo,, come terzo ed ultimo motivo che conferma l'importanza delle cellule Treg è, appunto, l'evidenza che l'assenza di Treg periferiche conduce all'autoimmunità T mediata e ad immunopatologie. Le cellule Treg furono studiate a partire dall'evidenza che alcune cellule T CD4+ erano in grado di sopprimere alcune risposte autoimmuni. Esse sono fondamentali nel mantenimento della tolleranza al self e sin dalla loro scoperta numerosi studi furono condotti per conoscere il modo in cui si stabilisce e si mantiene nonché come la risposta immunitaria adattativa ai non self è controllata per evitare danni all'organismo. La caratterizzazione di questo nuovo tipo cellulare, effettuata soprattutto dall'autore nipponico Sakaguchi, ha mostrato come queste cellule esprimono costitutivamente la molecola CD25 che le distingue da tutte le altre cellule T, delinea le loro linee di sviluppo, in particolare lo sviluppo timico, e caratterizza la loro potente attività immunosoppressoria in vivo e in vitro. Altra peculiarità saliente delle cellule Treg (CD4+ CD25+) risiede nella caratteristica espressione del fattore di trascrizione Foxp3 in modo specifico. La presenza di questo fattore di trascrizione permette l'espressione dei CD4 e CD25 ed è proprio la sua assenza o alterazione a determinare, attraverso il funzionamento

incorretto delle funzioni delle cellule Treg, patologie autoimmuni ed infiammatorie. All' inizio delle ricerche condotte su queste cellule è stata dimostrata l' importanza dello sviluppo timico per le loro funzioni attraverso una serie di esperimenti condotti sui topi nei quali, la deprivazione timica conduceva in breve tempo allo sviluppo di malattie autoimmuni e all' aumento dei livelli autoanticorpali sierici; era da definire come distinguere queste cellule CD4+ dalle cellule CD4+effetttrici. La scoperta del CD 25 (recettore per la catena α dell' IL2) definì questo nuovo gruppo di cellule che vennero chiamate, appunto per la loro funzione, cellule Treg. La scoperta del CD25+ permise , inoltre, di stabilire l' importanza dell' IL2: una citochina chiave per la crescita e il mantenimento della sopravvivenza di queste cellule la quale, ovviamente, mostrava un' alta affinità per l' IL2R (CD25), componente discriminante e fondamentale delle Treg. Studi in vitro mostrarono che le cellule Treg sopprimono la proliferazione di altre cellule CD4 e CD8 coltivate e messe a coltura con specifici antigeni in presenza di APC. Questi studi in vitro rivelarono, inoltre, la loro inabilità a produrre IL2, la loro scarsa risposta alla stimolazione antigenica e la loro capacità proliferativa in risposta alla presenza di TCR e di alti livelli di IL2. Inoltre le cellule Treg sopprimono direttamente le cellule CD4 attraverso il contatto cellulare senza necessità di fattori solubili. Fondamentale per l' espressione di queste cellule è il Foxp3. Come precedentemente esposto esso è legato alla presenza del CD25 infatti: le cellule T periferiche CD25+CD4+ e i timociti CD25+CD4+CD8- esprimono l' mRNA di Foxp3 e le cellule CD25-CD4+ sono incapaci di indurre l' espressione di Foxp3. È da segnalare la peculiarità di alcune cellule Treg che hanno funzione soppressoria ma non esprimono Foxp3. Esse sono state studiate grazie a topi knock out ed anticorpi monoclonali diretti contro Foxp3

che sono in grado di studiare questo target intracellulare attraverso tecniche di citometria a flusso. Attraverso queste tecniche è stato evidenziato che esiste, come precedentemente puntualizzato, una correlazione tra Foxp3 e CD25 ma particolare è stato il rilevamento del fatto che il 10% delle cellule Foxp3 è CD25 – e che un altro 10% di cellule è CD25+ ma Foxp3- ; esse probabilmente rappresentano cellule T effettrici attivate.

BIOLOGIA DEL FOXP3. Il gene FOXP3 (Forkhead BOX protein 3) localizzato sul cromosoma X in posizione p11.23. Si tratta di un gene espresso principalmente nel tessuto linfoide (timo, milza, linfonodi) e composto da 11 esoni che codificano per la proteina FOXP3 di 431 amminoacidi (73). Tale proteina appartiene alla famiglia P di regolatori trascrizionali FOX caratterizzati dalla presenza del dominio FKH (Forkhead-winged/helix) che deve il suo nome alla propria struttura costituita da tre α -eliche e due grandi loop. La proteina FOXP3 è composta da quattro domini funzionali: una regione N terminale ricca di prolina, un dominio centrale Zinc finger ed un Leucine zipper (entrambi conservano motivi strutturali strutture coinvolti nella interazione proteica) ed un dominio FKH (74) localizzato a livello della regione C-terminale la cui funzione è legare il DNA e la traslocazione nucleare. Il dominio carbossi terminale FKH è richiesto per la localizzazione nucleare e il legame col DNA svolto da Foxp3; questa funzione è svolta dalla presenza delle lisine. Per esempio, mutazioni all' interno del dominio FKH che distrugge l' interazione di Foxp3 e NFAT si esprimono nella perdita dell' abilità di Foxp3 di downregolare l' espressione di IL2 e upregolare l' espressione di CTLA4 e CD25. Beier ha dimostrato, in un articolo pubblicato nel gennaio 2012, come la mutazione delle singole lisine in posizione 382- Lys17Arg- (K17) e in posizione 393- Lys18Arg -(K18) ostacoli il legame di Foxp3

al DNA e inibisce la funzione soppressiva dei Treg in vivo e in vitro. La mutazione di queste lisine non va ad interferire con i livelli di espressione di Foxp3 ma inibisce il rimodellamento del promotore dell' IL2 ed ha un importante e diverso effetto sull'espressione del gene associato a T reg. La famiglia a cui appartiene FOXP3 comprende una serie di regolatori trascrizionali che possono agire da repressori o da attivatori e che risultano coinvolti in processi importanti come lo sviluppo del timo, il differenziamento cellulare e la regolazione della funzione linfocitaria. Nei mammiferi sono stati identificati quattro membri appartenenti alla famiglia del Foxp3: Foxp1 (FKH1 and FKHR), Foxp3 (FKHRL1; A000945) e Foxp4 (AFX) sono espressi naturalmente e regolati in maniera simile mentre Foxp6 è confinato a strutture specifiche del cervello ed è soggetto a distinti meccanismi regolatori. L'insulina, il fattore di crescita insulinico ed altri fattori di crescita inducono l'attivazione del fosfatidilinositol-3-OH chinasi e la chinasi Akt, che fosforilano tre aminoacidi. Queste modificazioni risultano nell'associazione della proteina Foxp3 con la proteina adattatrice 14-3-3, quindi l'esclusione nucleare e l'eventuale degradazione di Foxp3. Questi processi possono essere antagonizzati dai segnali indotti dallo stress che attivano la protein chinasi Jnk che risulta nella localizzazione nucleare di Foxp3. La specificità dei target di Foxp3 può essere ulteriormente raffinata dalla SIRT1 deacetilasi. L'attività di Foxp3 può essere regolata dai segnali derivanti dal Tcr e dal CD28 e da alcune citochine come l' IL2, l' IL3 e l' IL7. Essi fosforilano Foxp3 attraverso la via Akt, la chinasi Sgk, la chinasi inibitoria del fattore di trascrizione NF- κ B (I κ B) e l'esclusione dal nucleo di Foxp3. La mancanza di fattori di crescita causa la defosforilazione di Foxp3, lega Foxp3 ai promotori dei geni che codificano le molecole proapoptotiche Bim e Puma, ne inducono la trascrizione e l'

apoptosi delle cellule T. In contrasto con ciò l' espressione forzata di una forma nucleare costitutiva di Foxp3 nelle linee delle cellule T causa un arresto del ciclo cellulare. Inoltre Foxp3 è coinvolto nella persistenza delle cellule T CD4+ di memoria. La trasduzione di Foxp3 nelle cellule T naive aumenta l' espressione di CD25 e delle altre cellule Treg associate alla superficie cellulare come CTLA4 e GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein) mentre riduce la produzione di IL2, IFN- γ ed IL-4. Nella valutazione dell' importanza della funzione soppressiva di Foxp3 sono da stabilire i meccanismi alla base di essa; infatti Foxp3 attiva o reprime centinaia di geni in modo diretto ed indiretto attraverso la formazione di un complesso trascrizionale con altri importanti fattori di trascrizione come ad esempio il nuclear factor of activated T cells (NFAT), l' acute myeloid leukemia-1/runt-related transcription factor 1 (AML1/Runx1), l' histone acetyl transferase (HAT)/histone deacetyl transferase complex (HDAC) e probabilmente NF- κ B. L' attività di NFAT è controllato dal calcio e dalla calcineurina. Al momento dell' attivazione NFAT forma un complesso con AP-1 e NF- κ B e promuove l' espressione di IL2, IL4, Ctl4 e altri geni nelle cellule T contribuendo all'attivazione delle cellule T e alla loro differenziazione in cellule T effettrici. L' interazione tra Foxp3 e NFAT è utile per spiegare il loro effetto nel legame col DNA infatti una sostituzione nel gene di Foxp3 è in grado di causare una mutazione e di distruggere l' interazione tra Foxp3 e NFAT alterando la capacità di attivare CTLA4, CD25 e reprimere IL2. AML1/Runx1 è cruciale per l' ematopoiesi e soprattutto per lo sviluppo delle cellule T a livello timico. Essa è espressa nelle cellule T convenzionali e nelle Treg naturali ed ha una funzione diversa da NFAT che è defosforilato dalla calcineurina e traslocato dal citoplasma al nucleo dopo l' attivazione delle cellule T.

AML1/Runx1 può legare costitutivamente il promotore IL2 al sito a monte dei siti di legame per NFAT, AP-1 e NF-κB. Nell'attivazione cellulare può agire come un fattore implicato nell'organizzazione e nella facilitazione dell'assemblaggio dei complessi degli attivatori di trascrizione che contengono NFAT sul promotore IL2. In alternativa AML1/Runx1, soli o insieme ai partner con cui sono soliti interagire come p300 e la proteina legante CREB, possono cooperare con il complesso di trascrizione NFAT per attivare il promotore IL2. Invece, nel Treg, AML1/Runx1 si lega fisicamente al Foxp3 nella sua regione N-terminale attraverso i domini di leucina e la forkhead box. Rompendo il legame tra Foxp3 e AML1/Runx1 altera la soppressione della produzione di IL2 dipendente da Foxp3 e ne attenua l'attività soppressiva senza influenzare il legame di NFAT alle Foxp3. L'abbattimento di AML1/Runx1 nelle Treg abroga la loro attività soppressiva. Il controllo trascrizionale di Foxp3 coinvolge HATs come ad esempio TIP60 ed HDACs come HDAC7 and HDAC9. TIP60 acetila Foxp3 e promuove il legame di Foxp3 al promotore IL2 e ne aumenta la repressione. Resta tuttora da definire come l'interazione di Foxp3 con i coattivatori e i corepressori modifica la funzione di NFAT e AML1/Runx1 e controlla l'espressione dei geni target di Foxp3 e quindi IL2, Cd25, Ctla4 e Gitr. Un altro approccio nella comprensione del controllo esercitato da Foxp3 su Treg consiste nell'identificazione dei geni target di Foxp3 dell'intero genoma; essi codificano per numerose proteine (Gpr83 o Ecm1) espresse principalmente nelle Treg e nelle T cellule che trasducono Foxp3. Altri geni, come quelli codificanti per il granzima B e il fattore di trascrizione Helios sono altamente specifici per il Treg ma sono apparentemente espressi indipendentemente da Foxp3. Gli ultimi studi confermano che Foxp3 controlla centinaia di geni target (circa 700) e lega

direttamente circa il 10% di essi tra cui quelli che codificano le molecole di trasduzione del segnale (Zap70 e PTPN22), fattori di trascrizione (Crem), citochine (Il2), molecole di superficie cellulare (IL2ra, CTLA4, and FasL) enzimi per il metabolismo cellulare (Pde3b) e microRNAs intergenici (miR-155). È importante sottolineare che questi studi, compiuti sull'intero genoma, mostrano chiaramente come Foxp3 può essere sia un attivatore che un repressore della trascrizione a seconda del target. La caratterizzazione congiunta dei partner di Foxp3 e i geni target di Foxp3 ha rivelato che Foxp3 interagisce con fattori di trascrizione che in un altro modo facilitano l'attivazione delle cellule non Treg e la loro differenziazione in cellule T effetttrici. Questo suggerisce un funzionamento di Foxp3 in cui esso sostituisce o dirotta il sistema di trascrizione delle cellule T effetttrici convertendole, inoltre, in Treg. Esso, inoltre, interagisce con ROR γ t un fattore di trascrizione importante per la differenziazione delle cellule T naive in Th17 cellule di cui inibisce la differenziazione. Interessante è il meccanismo con cui le cellule Treg Foxp3 si sviluppano nel timo e nella periferia. Il timo sviluppa direttamente cellule Treg e, diversamente da tutte le altre cellule T sviluppate in questa struttura, esse sono già mature dal punto di vista funzionale cioè competenti per prevenire la soppressione del malattie autoimmuni e "antigen primed" ancor prima di incontrare l'antigene in periferia. I timociti si identificano precocemente come cellule CD4+CD8- mentre nella fase tardiva di sviluppo vengono identificate come CD4+CD8+, queste diverse caratterizzazioni indicano la presenza un programma di differenziazione attivato a partire da segnali prodotti dall'interazione tra i loro TCR e i complessi MHC/peptidi self presenti sulle cellule stromali del timo che sfruttano le molecole costimolatorie (CD28-B7) e i fattori umorali come le citochine che derivano dalle cellule stromali.

Le molecole i TCR delle Treg hanno un' altissima affinità per MHC e questo è funzionale per la corretta discriminazione delle cellule T altamente reattive per il self. A livello cellulare, sia le cellule midollari epiteliali del timo (mTECs) che le cellule dendritiche nel timo contribuiscono alla generazione di Treg, così come alla selezione negativa delle cellule T naive. Carenze nel tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) o nell' NF- κ B-inducibile chinasi provoca assenza di mTECs maturi, ostacolano lo sviluppo dei Tregs. Negli esseri umani, la citochina TSLP (thymic stromal lymphopoietin) secreta dai corpuscoli Hassal, derivanti da mTECs, sembra agire sulle cellule dendritiche timiche per promuovere la differenziazione dei timociti in cellule Tregs. Una popolazione di mTECs esprime, in modo ectopico, un insieme di antigeni tessuto-specifico (CST), come l'insulina, sotto controllo diretto o indiretto del gene Aire. È interessante notare che i topi con assenza di Aire sviluppano spontaneamente malattie autoimmuni simili a quelle prodotte dall' assenza di Treg. Le cellule T naive in periferia possono acquisire l' espressione di Foxp3 e conseguentemente la funzione Treg in diversi metodi sperimentali. La stimolazione con TGF β è ostacolata, in vitro, dalla presenza di IL6 una citochina che è in grado di bloccare la differenziazione periferica delle cellule T naive in Treg ma che induce, invece, la differenziazione delle cellule Th17. Quest' ultimo processo è bloccato dall' acido retinoico secreto dalle cellule dendritiche localizzate nel tessuto linfoide intestinale, lo stesso acido retinoico favorisce la differenziazione delle T naive in Treg Foxp3 ed infatti la somministrazione per via orale di antigeni proteici da parte di cellule dendritiche produttrici acido retinoico del tessuto linfoide associato all' intestino può indurre l' espressione di Foxp3 + Tregs ed è proprio questo meccanismo ad essere un plausibile candidato per la spiegazione della per

via orale. Tuttavia, resta da stabilire se le cellule Tregs indotte dalle cellule T naive in periferia sono funzionalmente stabili in vivo ed in quale misura contribuiscono al pool periferico dei Tregs Foxp3 +. Oltre Foxp3 + Tregs, ci sono altri tipi di cellule Treg che possono essere indotte in periferia a partire da cellule T naive, per esempio, T cellule CD4 + che secernono IL-10 e TGF- β , dette cellule Tr1, che sono prodotte in vitro mediante la stimolazione antigenica di cellule naive T in presenza di IL-10. Le cellule T antigene-specifiche secernenti TGF- β , chiamate cellule Th3, sono state inizialmente derivate da animali che sono stati resi tolleranti all' antigene proteico somministrato oralmente; all' interno di queste cellule Th3 alcune sembrano essere Tregs Foxp3 + indotte da TGF- β . Le cellule Tr1 non esprimono Foxp3, ma le loro proprietà in vitro sono molto simili a quelle delle cellule Tregs Foxp3 +. Ad esempio, essi presentano una diminuita proliferazione in risposta alla stimolazione antigenica, esercitano una soppressione dipendente dal contatto cellulare, producono scarsi livelli di IL-2, e visualizzano un fenotipo cellulare di superficie attivato. E' probabile che le Tr1 e le cellule Tregs naturali Foxp3 + condividano alcuni meccanismi soppressivi in vitro, sebbene la stabilità a lungo termine di cellule Th3 e Tr1 deve essere ulteriormente valutata in vivo. Studi hanno dimostrato che anche altre sottopopolazioni di cellule T CD8 +, compresi CD4-CD8-, e γ / δ cellule T avevano un' attività immunosoppressiva ma ad oggi ci sono scarse prove a sostegno del fatto che essi svolgano un ruolo cruciale nei naturali processi di auto-tolleranza. Una volta spiegato il meccanismo di sviluppo delle cellule Treg devono essere elencate le molecole e le modalità implicate nel controllo e quindi nello svolgimento della corretta funzione delle Treg. Le cellule che controllano questi meccanismi sono le APC e alcuni tipi specifici di linfociti T. Le prime, infatti, esprimono le

molecole costimolatorie e secernono le citochine, funzione condivisa anche con i vari tipi di linfociti T. Le cellule dendritiche espandono le cellule Treg attraverso la costimolazione mediata da molecole come CD80-CD86 la quale va ad attivare la secrezione di IL 6 una citochina importante e il cui ruolo verrà discusso in seguito. Le cellule T CD4+naive si differenziano, come precedentemente esposto, in cellule Treg sotto lo stimolo del TGF β ma esse, se stimolate da IL6 e TGF β , possono trasformarsi in Th17 secernenti IL17. L' IL2 facilita la differenziazione delle T naive in Treg ma blocca la differenziazione in Th17. È di fondamentale importanza spiegare la localizzazione e le vie di trasporto delle cellule Treg all' interno dell' organismo e la loro attivazione, proliferazione e differenziazione in risposta alla stimolazione antigenica. Le cellule dendritiche dei linfonodi drenanti presentano auto antigeni tessuto-specifici e sono arricchiti nei linfonodi regionali di cellule Tregs Foxp3 + specifiche per gli auto-antigeni del tessuto. Questo indica che le cellule Treg migrano e vengono attivate nei linfonodi regionali dove sono presentati gli antigeni tessuto specifici o gli antigeni microbici. Esse migrano, inoltre, nei tessuti infiammati, nei siti di infezione e nei tumori. Esse esprimono oltre al TCR, che riconosce antigeni specifici, uno spettro di recettori deputati all' homing tra cui le molecole di adesione e i recettori per le chemochine i cui pattern d' espressione correlano con l' eterogeneità funzionale delle Treg; queste molecole permettono oltre al controllo del traffico e la localizzazione la compartimentalizzazione della risposta immunitaria controllata da Treg. In seguito all' esposizione antigenica a livello linfonodale le cellule Treg vengono attivate ed esercitano un effetto soppressivo a concentrazioni di antigene molto più basse delle cellule T naive. Da esperimenti condotti negli anni 80 sui topi deriva la conoscenza del fatto che le Treg

naturali possono essere attivate anche dalle cellule dendritiche immature la cui espressione di CD80-CD86 e MHC/peptidi self sono troppo basse per attivare le cellule T naive autoreattive: questo consentirebbe alle Tregs naturali di esercitare la soppressione dominante delle cellule T auto-reattive. Essa potrebbe anche contribuire alla prevenzione di autoimmunità derivante dal mimetismo molecolare (la reazione crociata tra una molecola e una sostanza microbica) perché le Tregs potrebbero essere più facilmente attivabili delle cellule T autoreattive. Indipendentemente dalla proliferazione attiva che è una risposta agli stimoli di numerose molecole il numero di Tregs naturale è abbastanza costante negli animali (10% -15% delle cellule T CD4 +), indicando come la morte cellulare aiuti a mantenere l'omeostasi delle cellule Treg. Infatti, a seguito di stimolazione antigenica le cellule Tregs downregolano l'espressione di Bcl-2, una proteina antiapoptotica. Perché è importante studiare le anomalie delle Treg responsabili delle malattie immunologiche negli esseri umani? e come potrebbe essere sfruttate per controllare le risposte immunitarie fisiologiche e patologiche? Polimorfismi di molti geni tra cui CTLA4, IL2, CD25,PTPN22 contribuiscono in modo significativo alla suscettibilità genetica delle comuni malattie autoimmuni, come il diabete di tipo. La carenza di questi geni, in particolare CTLA4, IL2, e CD25, produce autoimmunità gravi nei topi presumibilmente attraverso un effetto sullo sviluppo e la funzione di Treg. Analogamente il blocco di CTLA-4 o neutralizzazione di IL-2 per un periodo limitato suscita malattia autoimmune mediate dalle cellule T in topi altrimenti normali. I fattori ambientali possono interessare le cellule Tregs e contribuiscono così allo sviluppo di autoimmunità. In condizioni fisiologiche le cellule Tregs mostrano una maggiore proliferazione e una maggiore attività metabolica rispetto

alle cellule non Tregs. Come conseguenza esse sono più sensibili alle radiazioni ionizzanti, ai farmaci radiomimetici (come la ciclofosfamida), e alla carenza di talune vitamine come l'acido folico. L' esaurimento della funzione di Treg causato dai motivi più vari può sia evocare l' autoimmunità sia scatenare e migliorare l'immunità tumorale nei roditori.

MECCANISMI CHE REGOLANO LA FUNZIONE Treg

1.SOPPRESSIONE CTLA4 MEDIATA

Come è stato ampiamente esposto in precedenza CTLA4 è un recettore di membrana costitutivamente espresso sia dalle cellule T effettrici che dalle cellule Treg che compete con il recettore CD28, localizzato in sua prossimità, per il legame con le molecole costimolatorie CD80-CD86 (B7-1 e B7-2) espresse sulla superficie delle APC. Per alcuni anni i meccanismi con cui CTLA4 esercitava questa funzione inibitoria sono rimasti oscuri ma lavori recenti di Qureshi (68) risalenti al 2011 hanno dimostrato come alla base della funzione di CTLA4 ci sia un meccanismo mediato dalla trans-endocitosi. Le cellule che esprimono CTLA4 catturano, con un processo mediato dall' endocitosi, i ligandi espressi dalle cellule APC (CD80-CD86) ed essa è stimolata dal coinvolgimento del TCR. Dopo la loro rimozione questi ligandi sono degradati all' interno delle cellule che esprimono CTLA4 con una conseguente compromissione della costimolazione CD28 mediata. Questo meccanismo di regolazione immunitaria, basato sulla deplezione cellulare estrinseca

del ligando, conferisce particolare importanza al ruolo di CTLA4 come molecola effettrice nell' inibizione della costimolazione mediata da CD28. Ad ogni modo, questo non sembra essere l' unico meccanismo di regolazione inibitoria in cui è coinvolto CTLA4. Il suo legame al CD80 o al CD86 induce la traslocazione nucleare del Foxp3 che inibisce l' espressione, da parte delle APC, dell' IL6 e TNF α . Questo è stato ampiamente dimostrato da studi effettuati nel 2009 da Dejean (75) e colleghi i quali, studiando topi knock out per Foxp3, hanno dimostrato come in essi ci fosse una grande espansione delle cellule T dopo un' infezione virale. Essa, però, non era mediata da meccanismi intrinseci ma era causata dalla capacità delle cellule dendritiche, derivante dall' assenza di Foxp3, di sostenere le risposte immunitarie attraverso la produzione di IL6. Infatti, come precedentemente anticipato, la stimolazione delle cellule dendritiche mediata dalla molecola coinibitoria CTLA4 induce la trascrizione di Foxp3 che inibisce la produzione di IL6 e TNF α . L' IL6 regola molti aspetti all' interno del sistema immunitario come: la produzione anticorpale, l' ematopoiesi, l' infiammazione e la sopravvivenza delle cellule T infatti l' IL6 salva le cellule T non attive dall' apoptosi inibendo la down-regolazione di Bcl-2 in modo dose-dipendente ed aumenta la sopravvivenza delle cellule T stimulate dall' antigene. L' IL6 è prodotta da vari tipi cellulari tra cui i macrofagi, le cellule dendritiche e le cellule B e la sua produzione è indotta soprattutto dalle infezioni, sia virali che batteriche, e questo è un' importante dimostrazione del fatto che essa è coinvolta nella risposta immunitaria primaria. Inoltre, l' attivazione del CTLA4 può causare l' espressione di IDO (indoleammina 2,3 diossigenasi) nelle cellule dendritiche. L' IDO è un enzima catabolizzante il triptofano espresso dai macrofagi e da altri tipi cellulari e questa caratteristica gli conferisce un ruolo immunologico più ampio sia

in relazione alla tolleranza che all' immunoregolazione. Ha effetti regolatori sulle cellule T che derivano dalla perdita del triptofano in specifici tessuti. L' enzima IDO catabolizza la conversione dell' aminoacido triptofano in kinureina, una molecola tossica per le cellule T prossime alle cellule dendritiche che vengono disposte all' apoptosi. CTLA4 riveste un ruolo vitale per la tolleranza e l' omeostasi immunitaria e perciò è importantissimo comprenderne la biologia e le modalità di azione. Ad esempio, l'espressione sulla superficie cellulare di CTLA-4 è controllata da trascrizione genica nonché dalla localizzazione intracellulare. Come risultato dello splicing genetico differenziale , CTLA- 4 ha tre diverse isoforme: la prima è la forma full-length (tutta intera)che è integrata nella membrana cellulare attraverso un dominio che lega i ligandi extracellulari e attraverso un dominio responsabile segnale di trasduzione intracellulare, la seconda è la forma solubile in cui manca il dominio legante membrana, la terza è la forma ligando indipendente che è stata identificata solo nei topi in cui manca la porzione extracellulare responsabile del legame con la proteina. CTLA-4 e CD28 mostrano un' omologia di circa il 30% e si legano agli stessi ligandi (CD80 e CD86) che sono espressi sulle APC. Sebbene il legame per CD28 sia più accessibile nelle cellule T Naive, CTLA-4 ha una forte affinità per il legame di CD80 e CD86 rispetto a CD28 e questo avviene in particolare per CD80(76).

Funzione cellulare autonoma di CTLA4

Nelle cellule T convenzionali, i segnali di CTLA-4 sembrano interferire con la produzione di IL-2, con la progressione del ciclo cellulare, e quindi, la proliferazione delle cellule T. L'attenuazione delle cellule T CTLA-4-dipendente può essere

attribuito in parte alla competizione di CTLA-4 su CD28 per il legame al CD80 e CD86 sulle APC, riducendo, così, i segnali CD28. Un recente studio ha infatti dimostrato che, quando è presente la stimolazione TCR, i granuli di CTLA-4 sono traslocati allo cSMAC (central supramolecular activation cluster) all'interno della sinapsi immunologica e si stabilizzano interagendo con i ligandi, mentre CD28 è esclusa dallo cSMAC. La traslocazione nello cSMAC è completamente dipendente dal legame con il ligando e, sebbene CD28 richiede elevate quantità di CD80 nella cSMAC, CTLA-4 è traslocato anche a bassa densità di CD80. I risultati indicano che CTLA-4 può controllare l'attivazione delle cellule T in situazioni in cui l'accesso alle molecole co-stimolatorie è limitato.

Oltre a competere con CD28, CTLA-4 è noto per mediare i suoi effetti attraverso la trasduzione un segnale negativo con una modalità cellulare intrinseca in seguito al legame con CD80 e CD86 o con un anticorpo anti-CTLA-4. Una grande quantità di dati mostra che la funzione inibitoria di CTLA-4 è mediata attraverso la sua coda citoplasmatica. La coda di CTLA-4 manca di attività enzimatica intrinseca ma contiene potenziali motivi per l'interazione proteica, che potrebbe trasmettere segnali che interferiscono con gli eventi a valle della segnalazione di TCR e CD28. Ci sono risultati coerenti nello studio dell'attività della fosfatasi associata con la regione citoplasmatica di CTLA-4, ed il dominio SH2 contenente la tirosina fosfatasi-2 (SHP-2) e la proteina fosfatasi 2A (PP2A) sono stati implicati nella trasduzione del segnale di CTLA-4. Sia SHP-2 che PP2A richiedono per l'associazione il motivo YVKM nel dominio intracellulare di CTLA-4. SHP-2 può attivare la via RAS, mentre PP2A inibisce la fosforilazione di Akt. Il dominio intracellulare di CTLA-4 è importante anche per la localizzazione sulla superficie cellulare perchè lega il complesso

adattatore associato alla clatrina AP2 con il motivo YVKM del dominio intracellulare di CTLA-4. Inoltre, CTLA-4 ha mostrato di indurre sia segnali positivi che provocano il salvataggio di cellule T attivate dall'apoptosi sia l'upregolazione di LFA-1 per migliorare l'adesione e la motilità cellulare. In particolare, l'espressione transgenica non solo della forma intera, ma anche di una forma priva della coda (cioè priva di una parte citoplasmatica) di CTLA-4 può salvare i topi *Ctla4*^{-/-} da stati infiammatori o autoimmunitari sistemici fatali. Per contro, la forma di CTLA-4 ligando-indipendente è anche in grado di attenuare l'attivazione delle cellule T. Insieme, questi risultati indicano chiaramente che le porzioni extracellulari ed intracellulari di CTLA-4 sono coinvolte nella regolazione delle risposte mediate dalle cellule T, e suggeriscono che non solo le funzioni intrinseche, ma anche quelle estrinseche mediate dalle cellule esprimenti CTLA-4 contribuiscono al controllo negativo delle risposte immunitarie mediate da CTLA-4.

Funzione cellulare non autonoma di CTLA-4.

I primi indizi della funzione cellulare non autonoma di CTLA-4 derivano da esperimenti effettuati usando chimere di midollo osseo di cellule wild type e cellule di midollo osseo carenti in CTLA4: nel primo caso gli animali restavano in salute mentre nel secondo caso sviluppavano un'autoimmunità sistemica fatale suggerendo l'esistenza di un meccanismo dominante o cellule-estrinseco alla base della regolazione immunitaria mediata dalle cellule T esprimenti il CTLA4 (72). Una serie di esperimenti hanno dimostrato come la mancanza specifica di CTLA4 nelle cellule Treg compromette la funzione soppressiva in vivo e in vitro di Treg e, analogamente a quanto accade per Foxp3, essi sviluppano patologie autoimmuni. Il

CTLA4 è vitale per le funzioni di Treg ma numerosi studi hanno evidenziato una serie di argomenti contro la necessità di CTLA4 per la funzione cellulare che coinvolgono nella serie complessa di meccanismi di interazione molecole come le citochine o cellule (DC). Essendo espresso sia sulle cellule T che sulle Treg è ragionevole pensare che CTLA4 espresso dalle cellule T attivate abbia un effetto soppressivo di tipo cellulare estrinseco sulle stesse cellule che lo esprimono e su altre cellule T attraverso la modulazione della funzione delle APC secondo un feedback negativo. Da un lato le cellule T attivate sono in grado, infatti, di down modulare l'espressione in vitro di CD80 da parte delle cellule dendritiche, anche se in modo meno potente delle Treg. Dall'altro lato è ben documentato che le cellule attivate aumentano l'espressione di CD80 e CD86 da parte delle cellule dendritiche attraverso la produzione di citochine infiammatorie come l'IFN γ e l'IL6 o attraverso l'espressione di CD40L. In questi modi le cellule T effettrici potrebbero esibire effetti apparentemente opposti sull'APC secondo un feedback positivo o negativo; infatti sono down regolati dal legame di CTLA4 a CD80 CD86 e dall'IL2 prodotta dalle cellule Th e sono upregolati dalle citochine e dal CD40L. La stessa espressione di queste molecole potrebbe influenzare nelle cellule T effettrici quale effetto far predominare. Sono richiesti, però, ancora numerosi studi perché restano da comprendere molte cose riguardo al CTLA4: come gli effetti intrinseci ed estrinseci sono legati alle funzioni cellulari autonome e non autonome, come ogni funzione contribuisce all'autoimmunità. All'immunità tumorale alla tolleranza ai trapianti e alla soppressione immunitaria e come questo può essere sfruttato per controllare la risposta immunitaria umana normale e patologica.

2. SOPPRESSIONE IL2 DIPENDENTE

Come precedentemente esposto nella spiegazione della biologia delle cellule Treg l'interleuchina 2 (IL-2) è un'altra molecola critica per la funzione dei Treg. Il marker specifico per le cellule Treg, CD25, è un componente fondamentale del recettore ad alta affinità per l'IL2 (IL-2R) il quale è fondamentale per lo sviluppo dei Treg. Si sospettava un ruolo fondamentale dell'IL2 nella crescita delle cellule T in vitro, studi condotti per confermare questi sospetti, però, mostrarono che l'IL2 non aveva particolari influenze sulla crescita delle cellule T ma i topi con assenza di IL2 sviluppavano spontaneamente malattie linfoproliferative, malattie infiammatorie con componente autoimmune ed iperreattività ai microbi commensali. I topi con assenza di CD25 o CD122 (un altro componente dell'IL-2R) vanno incontro ad un quadro patologico simile chiamato appunto sindrome di assenza di IL2 che si esplica nell'uomo in una malattia detta IPEX. I dati derivanti dagli studi suggeriscono che la sindrome è dovuta alla deficienza o alla disfunzione dei Treg per le seguenti evidenze:

1. Il numero dei Treg è diminuito nei topi in cui è assente sia Cd25 che IL2 e nei topi senza CD25 l'autoimmunità è prevenibile attraverso l'inoculazione con Treg.
2. L'assenza di STAT5a e b che media la segnalazione dalla catena β di IL-2R al nucleo, blocca la produzione delle cellule Treg e causa malattie autoimmuni.
3. La somministrazione a topi normali neonati di alte dosi di anticorpo monoclonale in grado di neutralizzare Treg e genera patologie autoimmuni simili a

quelle causate dalla perdita della corretta espressione dei Treg. L' IL2 è richiesta per sostenere l' espressione di Foxp3 e CD25 nei linfociti Treg ed attivare le loro funzioni soppressive. Le altre citochine , inoltre, contribuiscono allo sviluppo delle cellule Treg e al loro mantenimento ed esse sono abili di rimpiazzare in modo completo il ruolo dell' IL2 o prevenire la sindrome di assenza di IL2. Per esempio nel topo si ha una grave riduzione delle cellule Treg se viene a mancare CD25, IL2 , CD 122 (condivisa con IL-2R e IL-15R) o CD132 (condivisa con IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-21R, e IL-15R) o doppia assenza di IL2 e IL15 che conduce ad una profonda riduzione delle cellule Treg mentre il deficit dell' IL-4, IL-7 o IL-15 soltanto non altera il numero di Foxp3 né conduce all' autoimmunità. L' IL2 ha molti e diversi target come: cellule T CD4+ o CD8+, cellule B e NK ed ha funzioni pleiotropiche con effetti contraddittori sulla risposta immunitaria. Essa facilita la differenziazione delle cellule CD4+ in cellule di tipo Th1 e Th2, espande le cellule di memoria CD8+ e le cellule NK mentre promuove l' apoptosi delle cellule T attivate dall' antigene. In relazione alle cellule Treg le espande ad alte dosi, facilita la differenziazione TGFβ dipendente delle Tnaive in Treg ed inibisce la differenziazione TGF-β/IL-6 dipendente delle cellule naive in cellule Th17 dalla funzione infiammatoria. È evidente come la maggiore fonte di IL 2 siano le cellule T attivate e che c' è un feedback negativo nel controllo della risposta immunitaria mediata dall' IL2 e cioè: IL-2 prodotta dalle cellule T non regolatorie attivate contribuisce al mantenimento, all' espansione e all' attivazione delle cellule Treg che limitano l' espansione delle cellule T non regolatorie. Importante per il corretto funzionamento delle cellule Treg è la presenza di STAT5a e b. STAT5b è un membro dei trasduttori/attivatori di segnale di una famiglia di proteine di trascrizione, che regola la trascrizione genica

in risposta a varie citochine e fattori di crescita; esso è un trasduttore importante del segnale dell'IL-2 richiesto per mantenere l'espressione di FOXP3 a livello delle Treg. Il deficit di STAT5b causa un rarissimo disordine autosomico recessivo descritto poche volte in letteratura e che rientra da un punto di vista classificativo nelle sindromi IPEX like. I pazienti affetti presentano dimorfismi faciali (bozze frontali prominenti, naso a sella..), deficit di crescita staturale, infezioni gravi, eczema cronico e diarrea. La delezione di STAT5a/b nelle cellule CD4+ causa una marcata riduzione di espressione di FOXP3 e di cellule CD4+CD25+ sia nel timo che in periferia.

9. ALTERAZIONI DEL PRIVILEGIO IMMUNOLOGICO: CONDIZIONI PATOLOGICHE NELL' ALOPECIA AREATA

L'alopecia areata è una patologia autoimmune e numerose conferme a sostegno di questa ipotesi derivano dall' associazione dell' alopecia con altre malattie autoimmuni e con l'atopia, dalla presenza di infiltrato infiammatorio perifollicolare in presenza di malattia, dalla dimostrazione, da parte di studi genetici di associazione, di alopecia areata e HLA e dalla risposta positiva di questa malattia alla terapia immunosoppressiva o immunomodulatrice (77, 78, 82). È stato ipotizzato che l'alopecia areata si sviluppi in un capello precedentemente sano a causa del collasso del suo privilegio immunologico costitutivo. In accordo con questa ipotesi l'alopecia areata può manifestarsi in una persona geneticamente predisposta solo quando i segnali proinfiammatori, conosciuti per up regolare l'espressione dell'MHC di tipo I nel follicolo umano, espongono gli autoantigeni, precedentemente sequestrati nel follicolo, alle cellule preesistenti T CD8+ di natura autoreattiva. Se sono reclutati i segnali costimolatori ed altre cellule, come CD4+ e mast-cellule, l'infiltrato linfocitico può attaccare il follicolo. Una volta che il follicolo è stato attaccato si potrebbero generare autoantigeni ed essi potrebbero essere presentati durante l'anagen sotto forma di peptidi associati alla melanogenesi. Evidenze a favore del fatto che il processo patogenetico alla base dell'alopecia areata sia un meccanismo autoimmune mediato dalle cellule T CD8+, attraverso l'interazione delle cellule T CD4+, derivano dagli studi condotti su modelli murini sviluppati, appunto, per studiare meglio questa patologia. Essi sono:

- il modello SCID: l'iniezione di cellule T CD8+ dallo scalpo umano sul topo non solo causa la perdita di capelli ma induce anche l'espressione di ICAM1, HLA-DR, HLA-A, HLA-B, e HLA-C sull'epitelio follicolare. Le cellule T CD4+ erano osservate attorno al follicolo, mentre l'infiltrato perifollicolare era costituito da cellule T CD8+ così come accade in condizioni normali. Inoltre il trasferimento di cellule T CD8+ soltanto può indurre l'alopecia areata. Un'induzione ottimale della perdita di capelli richiede sia il trasferimento di cellule T CD4+ che di cellule T CD8+;

- topi C3H/ HeJ: l'iniezione subcutanea di cellule T di animali affetti in topi sani C3H/ HeJ induce la perdita di peli a chiazze nell'arco di alcuni giorni mentre l'iniezione di cellule T CD4+ non induce la perdita locale di capelli ma attiva il sistema immunitario murino per promuovere la perdita di peli a chiazze ma in un arco di tempo maggiore supportando l'idea che le cellule T CD8+ siano le cellule effettrici mentre le cellule T CD4+ svolgano una funzione di tipo "helper". L'iniezione di IL4 o di anticorpi specifici monoclonali anti IFN γ inducono la crescita dei capelli e l'analisi istologica mostra una diminuzione significativa delle cellule T CD8+ intorno il follicolo nei topi C3H/ HeJ con alopecia areata. In questi topi l'aumento della sostanza P conduce ad una rapida degranolazione delle mast-cellule e accelera la fase catagen di regressione follicolare accompagnata da un aumento delle cellule T CD8+ contemporaneo ad un aumento dell'espressione, da parte di queste ultime cellule, dei granzimi B e del recettore NK1R .

Studi di associazione genomica suggeriscono che altri fattori infiammatori ed i ligandi delle cellule NK potrebbero essere attivi in alcune fasi di sviluppo dell'alopecia areata. Le cellule NK, NKG2D e i loro ligandi endogeni sono state

spesso implicate nella patogenesi dell'alopecia areata: infatti poche cellule NK sono osservate nel follicolo sano in anagen mentre nel follicolo affetto da alopecia areata si riscontrano aggregati di NKG2D+ e CD56+. Questo è spiegato dal fatto che il follicolo in condizioni patologiche overesprime la proteina MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A), un agonista chiave di NKG2D, la cui espressione è molto limitata in condizioni normali.

La teoria del collasso del privilegio immunologico per la patogenesi dell'alopecia areata postula che la patologia si manifesta solo in individui geneticamente predisposti in cui coincidono quattro eventi:

- alterazioni del sistema di down regolazione del sistema MHC di classe I indotto soprattutto da IFN γ ;
- riconoscimento da parte delle cellule TCD8+ degli autoantigeni presentati dalle molecole MHC di classe I;
- attivazione della melanogenesi quindi il follicolo si trova in fase anagen;
- presenza di segnali costimolatori, cellule T CD4+ e altri stimoli attivatori che favoriscono un attacco mediato dalle cellule T CD8+.

Oltre a questi meccanismi di base, bisogna tenere conto di un ruolo chiave delle molecole immunosoppressive generate localmente (α MSH, TGF- β 1 e IGF-1) e dell'attività immunosoppressiva delle cellule NK (espressione di MIF) che sono considerati veri e propri "guardiani" del privilegio immunologico del follicolo la cui insufficiente attività e/o funzione predispone allo sviluppo di autoimmunità e quindi della patologia.

Il ruolo delle cellule T nella patogenesi dell'alopecia areata è supportato da diversi esperimenti in seguito riportati. Il trasferimento di zone di cute umana affetto da alopecia in topi immunodeficienti affetti da SCID causa nei topi la ricrescita dei capelli in modo simile a quanto accade con topi "nudi" (topi resi atimici dall'induzione di una serie di mutazioni genetiche e, perciò, immunodeficienti). In questi topi è possibile prevenire la ricrescita dei capelli attraverso l'iniezione di cellule T autologhe derivanti dallo scalpo che sono state attivate dalla coltura di cellule APC con follicoli omogeneizzati che fungono da fonte di autoantigeni e, quindi, sono essenziali ad indurre la perdita di capelli dopo l'attivazione delle cellule T. Né cellule T attivate in colture con IL2 e fitoematoagglutinina mitogena né cellule T messe a coltura con cellule dello scalpo prive del follicolo pilifero erano efficaci. Oltre alla perdita di peli, l'iniezione di cellule T attivate causa anche l'espressione di ICAM-1, HLA-DR e HLA-A, -B, -C nell'epitelio follicolare. In questi esperimenti le cellule T si disponevano in modo omologo a quanto accadeva nei modelli naturali di malattia; le cellule T CD4+ erano perifollicolari mentre le cellule T CD8+ erano intrafollicolari. IFN γ è espressa dalle cellule T e la proteina IFN- γ -inducibile (IP-10) è espressa dall'epitelio follicolare. Tuttavia le lesioni dell'alopecia areata non possono essere indotte soltanto dal trasferimento delle cellule T CD8+ e un' induzione ottimale della perdita di peli richiede il trasferimento sia di cellule T CD4+ che di cellule T CD8+.

Ne risulta che il mantenimento e la perdita del privilegio immunologico siano processi che richiedono molti passaggi e il coinvolgimento di molte strutture e perciò sono in atto numerosi studi al fine di comprendere la sequenza spazio-temporale alla base del mantenimento o dell'alterazione di questa importante

caratteristica del follicolo. Kang e coll., nel 2010, hanno studiato l'espressione dei geni sia nelle aree affette da alopecia che nelle aree perilesionali ed hanno confrontato l'espressione di geni e proteine per evidenziare la suscettibilità dei pazienti alla perdita di capelli. Questi studi hanno mostrato che alcuni geni, codificanti per specifiche molecole, erano up-regolati in entrambe le zone (geni codificanti per IL1Ra e CD80); altri erano diminuiti soltanto nelle aree lesionali ma non in quelle perilesionali non affette (geni codificanti per FasL) e altri, come geni codificanti per citochine (α MSH, TGF- β 1), erano diminuiti nella zona lesa e down-regolati sia nella zona affetta che nella zona perilesionale non affetta. Da questo studio è emerso, per la prima volta rispetto agli altri, che nelle aree perilesionali si evidenziavano due agenti immunosoppressivi significativamente diminuiti, essi sono: la molecola IDO e il Red/IK. Come precedentemente detto, IDO è implicato nella tolleranza Th1 mediata e la citochina Red/IK è coinvolta nell'inibizione degli antigeni MHC di classe II indotta dall'IFN γ , meccanismo fondamentale alla base della perdita del privilegio.

Nella perdita del privilegio immunologico e, quindi, nella comparsa dell' alopecia areata un ruolo importante è svolto anche dalle citochine. Pochi anni fa il nostro gruppo di studio ha investigato i livelli di 4 tipi di citochine (IL2, IL6, IL12, TNF α) nel sangue periferico di un gruppo di 105 pazienti affetti da alopecia areata al fine di relazionarli con la durata della malattia, l' età, il sesso, l' estensione della malattia e lo squilibrio immunologico. I livelli di citochine nel sangue sono stati misurati con metodi di radioimmunoassay e tecniche enzime-linked immunosorbent). I risultati derivanti da questo studio hanno mostrato che più della metà dei pazienti affetti da alopecia hanno livelli di IL 12 (54%) o TNF α (57%) al di fuori del normale range.

Questi livelli sono intimamente connessi con il sesso, il grado di alopecia e la durata. TNF α risulta più correlato con il sesso (femminile) e IL 12 con il grado e la durata di alopecia areata. I risultati di questo studio hanno mostrato che l'interazione tra fattori genetici, ambientali ed endogeni (modulazione psico-neuro-endocrina) sarebbe alla base di una disregolazione del sistema immunitario caratterizzata dall'attivazione di linfociti T autoreattivi contro autoantigeni e dalla liberazione di citochine capaci di amplificare e automantenere il fenomeno patologico. Nella nostra ipotesi patogenetica ad innescare una reazione immune più che un antigene esogeno potrebbe essere un antigene endogeno, la cui natura non è stata ancora chiarita, probabilmente un antigene citocheratinico, aggredito in una fase specifica del ciclo pilare . Ciò sarebbe supportato da numerosi studi di letteratura e dalle evidenze sperimentali che dimostrano come l'AA sia più frequente nei soggetti con storia familiare positiva per la malattia, nei soggetti immunodepressi o che abbiano comunque un substrato immunologico alterato. Spesso infatti l'AA si associa, come è emerso dalla nostra discussione, a patologie quali la dermatite atopica , la tiroidite di Hashimoto e altre patologie autoimmuni. L'ipotesi che la patologia sia geneticamente determinata è supportata inoltre dalla maggiore frequenza della malattia nei soggetti affetti da sindrome di Down. L'antigene sarebbe responsabile non solo dell'attivazione linfocitaria ma anche di quella macrofagica. Entrambe queste linee cellulari rilasciano una serie di mediatori che interagiscono tra loro. L'antigene , fagocitato e processato dalle APC verrebbe complessato alle molecole MCH di classe II, espresso sulla loro membrana e quindi riconosciuto dai linfociti T CD4+. Questi ultimi, grazie alla presenza di IL12 si differenzerebbero in Th1. I linfociti Th1 , attraverso il rilascio di INF γ , IL2, TNF β indurrebbero l'attivazione

macrofagica che, quindi, può avvenire anche per via indiretta. I macrofagi secernono varie citochine tra le quali rientrano quelle da noi dosate nel sangue periferico dei pazienti affetti e delle quali abbiamo cercato di indagare le principali funzioni:

1. IL12 : responsabile dell'attivazione dei linfociti T citotossici e dello switch isotipico verso Th1. Stimola, inoltre, la proliferazione delle cellule NK e aumenta la proliferazione e la produzione di IFN γ .

2. IL1 e TNF α : sono in grado di inibire la crescita del follicolo pilifero attraverso una induzione del telogen. Aumentano l'espressione di molecole di adesione, da parte delle cellule endoteliali dei vasi, come E-selectina , ICAM e VCAM1. A queste si legano linfociti neutrofili e monociti che, attraversando la parete del vaso,raggiungono il sito del danno tissutale.Il TNF α ha inoltre un effetto citotossico diretto, attiva i linfociti T quiescenti e promuove l'attivazione chemiotattica dei neutrofili. Stimola inoltre la secrezione di IL-1, IL-6 ed è un importante fattore angiogenico e di crescita per i fibroblasti

3. IL-6: agisce in sinergia con l'IL-1 nell'attivazione dei linfociti T. Avrebbe, inoltre, un ruolo chiave nell' attivare una nuova classe di linfociti Th, ancora oggetto di studio , definiti linfociti Th17 non classificabili né tra i Th1 né tra i Th2 e da cui è stata destata la nostra curiosità e attenzione. I linfociti Th17 producendo GM-CSF, TNF α , IL-6 e IL-17 contribuirebbero all'amplificazione del processo flogistico e soprattutto alla sua cronicizzazione.

4. IL-2: attiva sia i linfociti T citotossici che i linfociti B in associazione con IFN γ .

Da quanto emerso dalla nostra discussione l'alopecia areata si configura, quindi, come una patologia Th1 mediata. Tale ipotesi sarebbe supportata dai livelli notevolmente incrementati dell'IL-12 a livello del sangue periferico dei pazienti affetti, sia maschi che femmine. L'IL-12 tenderebbe ad aumentare progressivamente con la durata della malattia, determinando quindi una importante attivazione dei Th1, mediante uno switch isotipico verso questa classe linfocitaria. Lo "sbilanciamento" immunologico a favore dei Th1 rispetto ai Th2 verrebbe compensato da una successiva attivazione dell'IL-6 che agirebbe da fattore regolatore e immunomodulatore. I livelli incrementati dell'IL-6, che partecipa insieme con il TNF α e l'IL-1 al mantenimento del processo flogistico, favorirebbero quindi la cronicizzazione della malattia attraverso due meccanismi importanti:

5. Antagonizzando l'azione del TGF β 1 (responsabile dell'attivazione dei linfociti T regolatori) e favorendo lo sviluppo dei Th17. Questi ultimi mediante il rilascio di IL-6, TNF α , IL-17 attivano fibroblasti, macrofagi, cellule endoteliali e cellule epiteliali a loro volta responsabili della produzione di citochine infiammatorie, G-CSF GM-CSF che inducono il reclutamento dei granulociti. La produzione di componenti infiammatorie quali IL-6, IL-2, TNF α , metalloproteinasi e NOS2 contribuisce al perpetuarsi del processo flogistico.

6. Attivando la risposta anticorpale.

Accanto ad una attivazione immunitaria di tipo cellulo-mediato l'AA potrebbe essere sostenuta, infatti, anche da un meccanismo di tipo umorale. L'espressione aberrante di IFN γ indurrebbe sui linfociti B uno switch isotipico verso le sottoclassi

IgG2 α così come l'IL6, rilasciata dai Th2, promuoverebbe il differenziamento dei linfociti B a plasmacellule.

La risposta anticorpale nei confronti del follicolo pilifero sarebbe eterogenea, infatti pazienti con AA sviluppano diversi pattern anticorpali diretti verso le varie strutture del follicolo. Questa serie di eventi a cascata sarebbero responsabili del perdurare dell'infiammazione e da questi potrebbe dipendere la mancata guarigione dalla malattia. Il possibile esaurimento antigenico, legato alle varie fasi evolutive del ciclo pilifero, potrebbe, inoltre, spiegare i ripetuti episodi di riattivazione e remissione registrati nei pazienti affetti dalla patologia. Resta ancora da chiarire quale sia l'effettivo meccanismo responsabile della remissione della malattia e sul quale sarebbe importante soffermarsi viste le risposte spesso deludenti alla terapia. Abbiamo ipotizzato un possibile ruolo della "tolleranza" dei linfociti T nei confronti dell'antigene per cui in seguito a grosse o a ripetute quantità di antigene si instaurerebbe un processo di "inattivazione funzionale". Tale processo è fondamentalmente basato sul riconoscimento dell'antigene da parte della cellula T non seguito, però, dai segnali costimolatori, da parte delle APC (cellule presentanti l'antigene), necessari per la sua attivazione. La cellula T non va incontro a morte e continua a esprimere il suo TCR, ma diventa non reattiva nei confronti di un successivo incontro con l'antigene anche quando quest'ultimo venga presentato in condizioni ottimali (45). Altri possibili meccanismi in grado di determinare la "tolleranza" immunologica potrebbero essere rappresentati dall'anergia indotta dal riconoscimento di peptici antigenici mutati o fenomeni di apoptosi linfocitaria indotta da una iperstimolazione antigenica

La dimostrazione della diminuzione di queste cellule immunosoppressive a livello lesionale e perilesionale suggerisce che, ancor prima della comparsa delle chiazze, ci debba essere un degrado dell'ambiente immunosoppressivo normalmente presente. Esso può essere dovuto ad alcuni stimoli specifici (stress psico-emozionale che conduce all'infiammazione neurogenica della cute, traumi o infezioni) che conducono alla promozione della migrazione di IFN γ che produce NK e/o cellule T attivate nella fase anagen. L'espressione di molecole MHC di classe I, indotte dalla sostanza P o dall' IFN γ , potrebbe facilitare la presentazione degli autoantigeni alle cellule T CD8+; le cellule T CD8+ sono di cruciale importanza nel trasferimento dell'alopecia areata dal cuoio capelluto umano trapiantato su topi SCID attraverso l'interazione con gli autoantigeni ristretti per MHC di tipo I e il loro trasferimento è inoltre sufficiente a indurre lesione di alopecia areata nel modello murino C3H/HeJ.

Questi fatti supportano un'ipotesi di lavoro semplicistica ma plausibile per la patogenesi dell'alopecia: sotto il collasso del normale privilegio immunitario, indotto da aumentati livelli di sostanza P e IFN γ , le cellule T autoreattive riconoscono e rispondono agli autoantigeni presentati dall'epitelio in anagen attraverso l'espressione di MHC ectopici. A condizione che i segnali costimolatori e le cellule T CD4+ vengano emessi in modo appropriato, questo potrebbe condurre allo sviluppo di una risposta autoimmune contro il bulbo in anagen che conduce, infine, alle manifestazioni cliniche dell'alopecia areata. Inoltre quando i livelli del TGF- β 1, dell' IGF 1 e dell' α MSH (molecole implicate nella soppressione dell' MHC di tipo I e delle β 2 microglobuline) declinano potrebbe esserci l'espressione degli autoantigeni precedentemente sequestrati e, quindi, il collasso del privilegio immunologico. Le persone con un livello costitutivo alto di MHC di classe I

intraepiteliale potrebbero avere un rischio aumentato per questa patologia. Altri eventi pro-infiammatori, come la presenza di upregolazione degli MHC di classe II e la presenza di anticorpi diretti contro il follicolo, potrebbero influenzare la severità e il corso della patologia.

Questo modello di ipotesi, inoltre, corrisponde in modo idoneo alle attuali scoperte per quanto riguarda le cellule NK. Per esempio la stimolazione delle cellule NK, ottenuta dal legame con NKG2D generato dall'overespressione delle cellule endogene, conduce ad un'eccessiva secrezione di IFN γ che potrebbe predisporre, facilitare e/o accelerare il collasso del privilegio immunologico all'interno e intorno al follicolo pilifero. In concomitanza dobbiamo chiarire come una sub-popolazione selezionata di cellule NK può avere un effetto protettivo sullo sviluppo dell'alopecia areata e come i ligandi NKG2D sono critici nella patogenesi dell'alopecia areata e come colpirli da un punto di vista terapeutico.

Compito degli studi futuri, soprattutto di tipo neuroendocrinologico e neuroimmunologico, sarà capire il ruolo dello stress psicoemotivo, da sempre indicato come un importante fattore concausale nella malattia, nell'innescare e nell'aggravamento dell'alopecia areata. Come esplicito nella parte descrittiva del privilegio immunologico, lo stress emozionale è considerato un fattore che può determinare la comparsa di alopecia areata in quanto l'ormone dello stress (CRH) può indurre la degranolazione mastocitaria che rilascia, appunto, istamina. A conferma di quanto precedentemente detto alcuni studi hanno dimostrato i potenziali benefici dei farmaci antistaminici nella terapia dell'alopecia areata. Inoltre un case report di tre pazienti con comparsa di alopecia in seguito ad un forte

stress ha dimostrato la presenza di recettori per il CRH nella struttura del capello e la cute di questi pazienti, derivante dal cuoio capelluto, mostrava un intenso segnale per CRH-2 β , mentre campioni di cute provenienti dalle zone non affette degli stessi pazienti o da controlli sani mostravano un basso segnale per il recettore. L'espressione di CRH, ACTH e α MSH era significativamente aumentata nella cute di questi pazienti rispetto ai controlli. Queste evidenze correlano con la presenza di un sistema neurogenico attivo e di un'azione del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene a livello cutaneo. Ulteriori dati funzionali sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene sono stati riportati sia sullo stato basale, quindi non in condizioni di stress, sia in condizioni di stress in topi affetti e non affetti. I topi normali mostrano l'aumentata presenza nel sangue di corticosterone rispetto alle condizioni basali mentre i topi affetti non mostravano una significativa alterazione dei livelli di corticosterone. Questo risultato suggerisce che i topi affetti da alopecia areata hanno una risposta ridotta per gli stress acuti. Nel sistema nervoso centrale i livelli di mRNA di POMC sono incrementati nei topi affetti a livelli di stress basali anche se ancora maggiore è il loro aumento in caso di stress ripetuti; gli stessi topi mostrano un aumentato livello di attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nella cute. Gli stress emozionali potrebbero influenzare la patologia a causa della riduzione della risposta corticosteroidica contro gli ormoni e il danno immunologico. Al collasso del privilegio immunologico corrisponde l'esposizione di autoantigeni a cui segue l'attivazione di una risposta immunitaria da parte delle cellule T contro gli stessi. Non è stata identificata la natura degli autoantigeni ma si sa che essi sono alla base del caratteristico pattern anatomo-patologico detto appunto "swarm of bees" (sciame d'api).

10. LE BASI GENETICHE DELL' ALOPECIA AREATA.

L' alopecia areata(AA) è, come precedentemente detto, una malattia autoimmune influenzata nel suo sviluppo e nella sua progressione da fattori genetici ed ambientali. Si rende pertanto necessario l' individuazione dei loci genetici implicati nella perdita del privilegio immunologico al fine di migliorare la comprensione della patogenesi di questa malattia. È importante sottolineare come, tra i loci studiati, molti sono in comune con altre patologie autoimmuni perchè coinvolti sia nell' immunità innata che adattativa suggerendo, quindi, una sovrapposizione dei meccanismi genetici alla base dello sviluppo di queste patologie (79, 81, 82).

Gli studi di associazione genetica hanno dimostrato come la regione più suscettibile per l' AA derivi dal sistema HLA, localizzata sul cromosoma 6p21.32 e, in maniera specifica, gli alleli di HLA-DQB1*03 che codificano per gli eterodimeri DQ7. Uno studio effettuato da Martinez e colleghi nel 2007 (80), attraverso una ricerca genome-wide per il linkage genetico in 20 famiglie affette da alopecia areata, ha identificato quattro geni suscettibili sul cromosoma 6, 10, 16 e 18. Un notevole contributo genetico deriva dai recenti studi sulle associazioni genome-wide (Genome wide association studies-GWAS-) che hanno identificato nuove regioni cromosomiali collegate allo sviluppo di questa patologia. Nell'epidemiologia genetica, uno studio di associazione genome-wide (in inglese genome-wide association study, o GWAS), è un'indagine di tutti, o della maggior parte, i geni di diversi individui di una particolare specie, per determinare le variazioni geniche tra gli individui in esame tentando di associare le differenze osservate con alcuni tratti

particolari, a patologie. Perché ciò sia possibile vengono analizzati campioni provenienti da molti individui cercando i polimorfismi dei singoli nucleotidi. Questi studi mettono a confronto il DNA di due gruppi di soggetti: individui affetti e individui sani. Nei campioni studiati vengono prelevati dei campioni cellulari da cui viene estratto il DNA, analizzato tramite un microarray in grado di leggere milioni di sequenze e di individuare, tramite tecniche bioinformatiche, gli SNP marcatori di gruppi di variazioni geniche. Quando le variazioni sono significativamente più frequenti negli individui malati allora è possibile concludere che sono associate con la malattia e vengono considerate indicative della regione in cui è probabile che si trovi la mutazione che causa la malattia stessa. Il genoma umano contiene milioni di SNP e migliaia di altre mutazioni genetiche che possono causare effetti sul fenotipo. Le alterazioni che causano alterazioni non visibili nel fenotipo sono dette mutazioni neutrali e vengono sfruttate per segnalare, dopo averle individuate, le mutazioni che causano malattia secondo il principio del linkage genetico. Uno studio di associazione genome-wide permette ai ricercatori di campionare 500.000 o più SNP da ogni soggetto, uniformemente distribuiti lungo il genoma. Dalla loro applicazione è derivata l'identificazione di fattori di rischio e fattori protettivi per patologie come l'asma, il cancro, il diabete, le malattie cardiache, i disturbi psichici, e, nel nostro caso, l'alopecia areata. Un SNP è un polimorfismo e cioè una variazione del materiale genico a carico di un unico nucleotide tale per cui l'allele polimorfico risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%; al di sotto di tale soglia si può parlare di mutazione. In una popolazione è possibile determinare un parametro detto: minor frequenza allelica. Esso è dato dal rapporto tra la frequenza tra la variante più rara e la variante più comune di un determinato SNP. È

importante ricordare che possono esistere variazioni notevoli tra popolazioni umane perché un determinato SNP può essere molto comune in un gruppo e molto raro in un'altra popolazione. Gli SNPs sono localizzati in diverse strutture del cromosoma: possono essere presenti all'interno di una sequenza codificante di un gene, all'interno di una regione intronica o in una regione intergenica. Gli SNPs all'interno di un gene, in ogni caso, non necessariamente modificano la sequenza amminoacidica codificata, dal momento che il codice genetico è degenerato. Uno SNP che genera in tutte le sue forme lo stesso peptide è detto sinonimo (synonymous); in caso contrario è detto non-sinonimo (non-synonymous). Gli SNPs che non si trovano in una sequenza codificante possono, in ogni caso, presentare sequenze negative sullo splicing o sul legame dei fattori di trascrizione. Sorprendentemente, nell'analisi GWAS, la maggior parte dei SNPs associati alla malattia non sono in una regione genica adibita alla codificazione di una proteina ma si trovano in una regione non codificante o in un introne. Gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche umane. SNPs con minor frequenza allelica pari o maggiore all'1% sono presenti ogni circa 100-300 paia di basi lungo l'intero genoma. In media, due SNPs su tre vedono una variazione tra citosina e timina. In medicina lo studio degli SNP è molto utile non solo per lo studio genetico (sono, infatti, generalmente ereditati di generazione in generazione) ma anche per la comprensione della patogenesi delle malattie e, ultimamente, notevole è stato il loro ruolo nella conoscenza della metabolizzazione dei farmaci. Un metodo valido per individuare gli SNPs è la valutazione dei RFLP (restriction fragment length polymorphisms) basati sulla presenza a livello allelico degli enzimi di restrizione: se un allele contiene un sito di riconoscimento per un enzima di restrizione ed un altro

no, la digestione dei due alleli genererà due frammenti di dimensione differente. In realtà il metodo più utilizzato ultimamente è basato sulla presenza dei microarrays che, come precedentemente detto, consentono un'analisi più rapida di un maggior numero di geni.

Come detto a proposito degli GWAS e degli SNPs, gli studi GWAS hanno identificato regioni cromosomiali specifiche collegate allo sviluppo di alopecia areata come: 2q33.2 (CTLA4), 4q27 (IL-2/IL-21), 6q25.1 (ULBP), 10p15.1 (IL-2RA) e 12q13 (IKZF4). Un'associazione importante deriva dal single-nucleotide polymorphisms (SNP) in 9q31.1 e 11q13, per il gene espresso nel follicolo del capello (STX17 e PRDX5, rispettivamente) e nella regione intronica del gene SPATA5. Questi studi potrebbero fornire spunti nella patogenesi dell'alopecia areata e possono migliorare il modello predittivo del rischio genetico. Seguendo gli individui con un elevato rischio genetico per alopecia areata, inoltre, l'analisi genetica potrebbe contribuire come supporto nella comprensione del ruolo dei fattori ambientali (eventi stressanti, dieta, infezioni, etc..) allo scopo di sviluppare nuovi approcci clinici per il trattamento dell'alopecia areata. Come per molte altre patologie autoimmuni, alcune delle quali correlate alla manifestazione dell'alopecia areata, questa patologia non segue una via mendeliana di trasmissione genetica ma ha un'eziologia multifattoriale in cui, appunto, sono coinvolti ed interagiscono sia fattori ambientali che genetici. Le infezioni, le carenze dietetiche e gli stress psicologici sono stati coinvolti come fattori scatenanti e/o aggravanti l'alopecia areata. L'importanza delle componenti genetiche, invece, è supportata dalle indicazioni epidemiologiche che mostrano come l'alopecia areata abbia un'associazione familiare: il 10-47% dei pazienti ha una storia familiare positiva e il rischio di

ricomparsa è maggiore tra parenti. L'incidenza di alopecia areata in figli, fratelli e genitori del paziente affetto è stata riportata rispettivamente come il 2%, 3% e 7%, con un rischio di presentazione della malattia durante il corso della vita del paziente (lifetime risk) del 6%. Ulteriore conferma del ruolo della genetica nell'alopecia areata deriva dall'alto tasso di concordanza nei fratelli monozigoti piuttosto che nei dizigoti (42-55% vs. 0-10%). Importante è la relazione con le malattie autoimmuni che correlano con l'alopecia areata che si presentano, oltre che nel paziente affetto da alopecia, anche nei suoi parenti, soprattutto di primo grado, confermando come le componenti genetiche determinanti per l'autoimmunità sono condivise tra tutte queste patologie. Ulteriore conferma alla natura autoimmune dell'alopecia deriva dagli studi effettuati su modello sperimentale murino C3H/HeJ, sviluppato, appunto per comprendere e studiare questa patologia. Questi studi genetici, effettuati con metodi basati sul linkage familiare e sugli studi di associazione del gene, basati sulla popolazione, sono stati usati per identificare i loci e gli alleli che contribuiscono alla predisposizione per l'alopecia areata. Recenti studi di associazione genome-wide, basati sull'identificazione di polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) che determina la suscettibilità per malattie comuni, sono stati applicati sia ad un grande numero di pazienti affetti da alopecia areata che a controlli permettendo di aumentare le nostre conoscenze dei markers genetici coinvolti nell'espressione fenotipica di questa complessa malattia.

ALOPECIA AREATA E GENI HLA

Come esposto nella parte dedicata alle componenti del privilegio immunologico, in condizioni normali e patologiche, la patogenesi dell' alopecia areata è relativa all' attivazione delle cellule CD4+ e CD8+ che infiltrano il follicolo in anagen, intorno e al suo interno. Questa dimostrazione costituisce un importante collegamento per l' associazione tra la patogenesi dell' AA e i geni dell' HLA di classe I e II. Nel tessuto prelevato dal cuoio capelluto di pazienti affetti da alopecia areata è stata riportata l' espressione aberrante di eterodimeri di HLA. Come precedentemente ampiamente esposto gli HLA mappano nel cromosoma 6p21.3 e codificano per le proteine di superficie cellulare importanti nella presentazione dell' antigene e nel riconoscimento del self da parte delle cellule linfocitarie. Per quanto riguarda gli HLA di classe I alcuni studi, effettuati negli anni 70 ed 80, hanno riportato un' associazione con l' alopecia areata che non è stata confermata, però, da studi successivi. I risultati sugli antigeni studiati sono stati diversi nei diversi gruppi etnici come ad esempio: HLA-B12 nei pazienti Finlandesi e B18 nei pazienti israeliani. Sono state descritte associazioni con HLA-A1, A2, A28, B40, B62, Cw3 and Cw7 ma le stesse non sono state replicate. Per quanto riguarda l' HLA di classe II, vari alleli di HLA-DQB1 e -DRB1 sono stati spesso in grado di suggerire che essi conferiscono un alto rischio di sviluppare la malattia sia per gli studi caso controllo che per gli studi basati sulle famiglie affette. Le prime analisi, condotte a livello sierologico, indicano che DR4, DR5, DR6, DR7 e DQ3 erano eterodimeri a rischio per lo sviluppo di alopecia areata. Studi più recenti, condotti a livello molecolare, hanno dimostrato

un significativo aumento di frequenza dell' allele DRB1*11:04 in pazienti con alopecia areata collegata principalmente alla forma precoce e ad un' alto rischio di ricorrenza familiare. Le analisi di associazione genetica tra l' estensione della malattia e particolari alleli di DRB1 ha generato diversi risultati con la variante DRB1*11:04 che è fortemente correlata all' alopecia areata totale o universale in alcune popolazioni ma non in altre e la variante DRB1*04:01(molecole DR4) generalmente associate con le manifestazioni cliniche più aggressive. Tra i geni HLA-DQ la variante DQB1*03, collegata da un punto di vista sierologico agli eterodimeri DQ7, è stata analizzata in modo estensivo e confermata come il maggior allele di rischio per lo sviluppo dell' alopecia areata in diversi studi di popolazione. La positività al DQ7 è nota perché è in grado di conferire il maggior effetto genetico nella popolazione caucasica con una prevalenza dell' 85% nei pazienti rispetto al 46% della popolazione generale; inoltre la più forte associazione è stata trovata tra l' allele DQB1*03(DQ7) e gravi fenotipi per l' alopecia areata.

È interessante notare che solo la variante DQB1*03(DQ7) codifica per una catena β che trasporta l' acido glutammico nella posizione 45 in uno dei due domini extracellulari che potrebbero mostrare un' aumentata affinità di legame con gli antigeni del follicolo pilifero ed, inoltre, spiega i meccanismi molecolari che sottendono la suscettibilità genetica all' alopecia areata mediata da DQ7. Inoltre un' aumentata frequenza dell' allele DQB1*02:02 frequentemente coereditato con la variante DRB1*07, è stato osservato in pazienti con alopecia areata negativi per DQ7. È particolare il fatto che alcune varianti dell' HLA di classe II, come gli alleli HLA-DRB1*03:01, DRB1*13 e DQB1*06, sono stati descritti come protettivi contro lo sviluppo dell' alopecia areata. Le differenze evidenziate nei vari studi sono

probabilmente da attribuire alle differenze etniche della popolazione analizzata e alla progettazione dello studio ed infatti è difficile determinare con certezza se le numerose associazioni con HLA siano dovute all' eterogeneità delle malattie o se siano effetti causali tipici del forte linkage disequilibrium tra le regioni HLA. I dati della letteratura evidenziano che le differenti popolazioni hanno caratteristiche frequenti non solo per gli alleli individuali ma anche per le combinazioni alleliche privilegiate. Tra la popolazione caucasica la variante DQB1*03:01 (DQ7 in sierologia) è quasi sempre ritrovata in associazione con gli aplotipi DR11/12 e meno frequentemente è correlata con DR4 in modo che l' associazione di DRB1*11:04 con il rischio di alopecia areata totale o universale possa essere dovuto al linkage disequilibrium con l' allele DQB1*03:01. Anche se tutte queste varianti sono comuni nella popolazione sana ,l' allele DQB1*03(DQ7), coinvolto nell' aplotipo tipico della popolazione a rischio, è rappresentato in modo maggiore nei casi piuttosto che nei controlli, suggerendo come l' HLA-DQ sia associato principalmente con l' alopecia areata. La forte correlazione tra le varianti nella regione degli HLA e l' alopecia areata è stata inoltre confermata dalle recenti analisi del genoma; in modo particolare gli SNPs associati all' alopecia areata sono fisicamente vicini ai loci per DRB1 e DQB1 e sono fortemente collegati con l' allele HLA-DQB1*03 che corrisponde da un punto di vista sierologico alla glicoproteina HLA-DQ7 e perciò si può concludere che le scoperte derivanti dall' analisi genomica sono coerenti con la precoce associazione di AA e i classici alleli HLA.

ALOPECIA AREATA E GENI NON-HLA

Particolari alleli di HLA sono stati implicati come fattori di rischio per l' alopecia areata anche se essi non sono sufficienti per spiegare la suscettibilità genetica della patologia. Le analisi del linkage e dei casi-controllo hanno condotto all' identificazione di molte regioni cromosomiche non collegate ad HLA e al riconoscimento di una serie di geni che potrebbero avere un ruolo nella patogenesi di questa malattia. Partendo dall' osservazione che l' alopecia areata è più comune nella sindrome di Down e nella sindrome polighiandolare autoimmune di tipo 1 rispetto alla popolazione generale, molti studi si sono focalizzati sullo studio del cromosoma 21q22.3 come la regione più probabilmente suscettibile per lo sviluppo di alopecia areata. Infatti è stata riportata un' associazione significativa tra l' alopecia e il polimorfismo nell' introne +9959 del gene MX1. Il gene myxovirus resistance 1 (MX1) codifica per la proteina p78 indotta dall' interferone, esso è localizzato sul cromosoma 21q22.3 e contiene 17 esoni che si estendono per 33kb (57). Caratteristico è il suo pattern d' espressione perchè è espresso molto più nei bulbi in anagen dei pazienti con alopecia areata che nei bulbi in anagen dei controlli sani. Lo screening di 4747 bp all' interno del gene MX1 ha rivelato quattro SNPs nell' introne 6 ed in uno studio caso-controllo è stata riportata solo un polimorfismo (+9959) con associazione significativa con lo sviluppo dell' alopecia areata. L' impatto di MX1 nello sviluppo della malattia è stato, quindi, supportato dall' osservazione di una forte espressione della proteina MX1 soltanto nei follicoli di pazienti coinvolti dall' alopecia e non nei follicoli in condizioni sane e dall'

associazione tra alopecia e polimorfismo dell' introne +9959 del gene MX1. L' evidenza dell' associazione tra il gene MX1 e lo sviluppo di alopecia areata potrebbe rendere questo gene uno dei probabili marker della patologia. Lo studio dei diversi SNPs nel gene AIRE nel cromosoma 21q22.3 ha identificato specifici alleli ed aplotipi che predispongono fortemente allo sviluppo di alopecia areata. Il gene AIRE, ereditato con modalità autosomica recessiva, codifica per il fattore di trascrizione AIRE (autoimmune regulator) la cui espressione è stata ritrovata in tessuti specifici come ad esempio le cellule epiteliali timiche midollari e le cellule dendritiche timiche e, quindi, a causa della sua localizzazione controlla l' espressione e la presentazione degli antigeni self nel timo. Risulta pertanto evidente che la sua mancata o alterata regolazione potrebbe danneggiare la tolleranza centrale e contribuire allo sviluppo di processi autoimmuni come accadrebbe per l' alopecia areata. Le mutazioni per il gene AIRE sono state rintracciate in caso di patologie autoimmuni autosomiche recessive che conducono alla produzione di cloni cellulari di cellule T autoreattive in periferia ma non sono stati ritrovati, nella popolazione generale, mutazioni del gene AIRE associate alla comparsa di alopecia areata sebbene due alleli polimorfici AIRE916G e T1029C (che permettono la sostituzione degli aminoacidi in posizione S278R e V301A), erano aumentate nei pazienti Caucasici affetti da alopecia areata specialmente nella forma di alopecia totale. Comunque uno studio caso-controllo effettuato in Belgio e in Germania non supporta l' ipotesi che il polimorfismo del gene AIRE g.961C>G (S278R) sia associato con un rischio aumentato di alopecia areata ma un altro studio , condotto sempre sulla popolazione caucasica e basato sulla determinazione dell' associazione genetica derivante dall' analisi dell' aplotipo che includeva anche i sei SNPs del gene

AIRE (C-103T, C4144G, T5238C, G6528A, T7215C e T11787C), ha mostrato la forte associazione tra l'allele AIRE 7215C e lo sviluppo di alopecia areata. Comunque molti studi di genetica classica sono limitati dalla relativamente piccola dimensione del campione, dal bias di selezione del campione, dal basso potere statistico e risultati dagli effetti variabili o modesti e perciò si è ritenuto opportuno proseguire le indagini scientifiche con modelli di studio genetici più avanzati come lo studio del genoma. Lo studio del genoma è basato sull'esame di un largo numero di SNPs (10^4 - 10^6) all'interno dell'intero genoma di centinaia di individui ed ha aumentato rapidamente le nostre conoscenze del background genetico dell'alopecia areata attraverso l'identificazione di nuovi loci genetici a rischio, al di fuori della regione HLA, che mostrano un'importante associazione con la malattia.

Molti di questi geni non HLA candidati, come ad esempio IL-2/IL-21, IL-2RA, IKZF4, ERBB3 e ULBP, sono localizzati in blocchi genomici che sono caratterizzate da un moderato linkage disequilibrium e sono coinvolti in una serie distinta di reti di segnalazione comprendente la produzione di citochine e l'attivazione cellulare a cui segue la proliferazione delle cellule T che, come detto, giocano un ruolo essenziale nel controllo della risposta immunitaria e nel mantenimento della tolleranza al self. Le proteine ULBP (cytomegalovirus UL16-binding protein), il cui gene si trova sul cromosoma 6q25.1, codificano per un ligando del recettore che è espresso sulle cellule NK (NKG2D) e su alcune cellule CD8⁺. Le proteine ULBP sono, quindi, in grado di bloccare il recettore per le cellule NK (NKG2D) e favorire lo sviluppo di disfunzioni derivanti da NK. Come spiegato nell'esposizione del privilegio immunologico, il maggior ligando di NKG2D è la proteina MICA, correlata alla famiglia ULBP, strettamente implicata nella comparsa di alopecia areata nonché

up-regolata nei follicoli in cui è alterato il privilegio immunologico e in cui compaiono, quindi, chiazze alopeciche. Quanto precedentemente spiegato è dimostrabile nel topo C3H/HeJ, un modello animale ben consolidato per lo studio dell' alopecia areata, in cui la perdita di cellule NK accelera in modo significativo l' insorgenza della malattia evidenziando il potenziale coinvolgimento delle cellule NK nelle malattie autoimmuni. Bisogna considerare che questi fattori genetici si sovrappongono del tutto con i fattori genetici di altre patologie e supportano l' ipotesi che sia l' immunità innata che adattativa sono coinvolte nell' eziologia dell' alopecia areata. A questo proposito l' analisi di associazione ad alta risoluzione del locus per CTLA4 ha recentemente mostrato che gli specifici polimorfismi (rs12990970, rs231775, rs3087243 e rs1427678) influenzano significativamente il rischio di alopecia areata in un gran numero di paziente dell' Europa centrale, poiché essi sono correlati soprattutto con la forma più aggressiva della malattia. John e coll. nel 2011 hanno mostrato che in pazienti affetti da patologia grave il CTLA4 ha un effetto maggiore nell' implicazione della suscettibilità. La dimensione dell' effetto genetico osservato nel campione di John è paragonabile a quello di altre malattie autoimmuni ma per la sua espressione, non ancora completamente conosciuta va considerata la possibilità che una variante sia in linkage disequilibrium con gli altri SNP ritrovati e quindi sia la variante che causa la patologia. Pethukova e coll. nello studio sull' associazione genetica del 2010 ha esaminato la variante rs1024161; essa non è stata esaminata da questo studio di John che ha preferito concentrarsi sulla variante rs3087243 (non valutata da Pethukova) che ha mostrato un' associazione significativa con la patologia. L'associazione dell' aumentata espressione di CTLA4 con patologie quali il diabete mellito di tipo 1 e patologie

tiroidee su base autoimmune, è stata una delle prime dimostrazioni di come la variazione dell' espressione delle molecole costimolatorie può avere un impatto importante nella suscettibilità delle malattie autoimmuni. Infatti, come precedentemente esposto, CTLA4 svolge un ruolo fondamentale nella messa a punto dell' immunità cellulare attraverso la regolazione negativa della trasduzione del segnale intracellulare; in questo modo le varianti genetiche in grado di modulare l' attività di CTLA4 possono essere probabilmente un punto di collegamento tra la risposta regolata dalle cellule T e l' insorgenza , anche, dell' alopecia areata. Ulteriori studi di associazione genome-wide hanno rivelato la presenza di particolari SNPs localizzati nelle sequenze del DNA che comprendono PRDX5 e STX17, due geni espressi, come ULBP, nel follicolo pilifero. STX17 (rs10760706, P53.6031027) è espresso nel follicolo pilifero ed è associate nei cavalli al fenotipo corrispondente alla presenza di pelo grigio. Questo fatto non è trascurabile perché l' alopecia areata, come ampiamente spiegato in precedenza, attacca i capelli pigmentati. PRDX5 (rs694739, P54.1431027) è un enzima antiossidante coinvolto nella risposta cellulare allo stress ossidativo, un processo che non è più idoneamente controllato nella porzione di cute alopecica. Ulteriori evidenze a sostegno del suo coinvolgimento nello sviluppo di malattie autoimmuni deriva dal fatto che esso è stato implicato nella degenerazione delle cellule target in molte patologie autoimmuni e che molti altri membri della famiglia PRDX possono essere espressi come autoantigeni. L' alterato funzionamento di PRDX5 potrebbe essere perciò sia alla base della malattia sia responsabile della sua progressione. La progressione degli studi genome-wide ha mostrato, inoltre, come l'alterazione per il gene SPATA5 (Spermatogenesis- associated protein 5) , codificante per una proteina con un

dominio ATPasico probabilmente coinvolto nella subunità regolatoria della proteasi 26S, sia in grado di raggiungere una significatività statistica per l'associazione con l'alopecia areata.

ASSOCIAZIONE GENETICA DEI POLIMORFISMI DI HLA DQB1 ED HLA DRB1 CON ALOPECIA AREATA NELLA POPOLAZIONE ITALIANA.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Come precedentemente esplicitato i numerosi studi condotti hanno mostrato un' associazione tra specifici HLA e rischio di sviluppare alopecia areata. L' obiettivo del nostro studio , condotto per la prima volta nella popolazione italiana, è stato quello di studiare i livelli di HLA e provvedere evidenze per l' associazione dell' alopecia areata con specifici alleli, come HLA-DQB1 and HLA-DRB1, secondo il modello di studio caso-controllo.

Da quanto trattato in precedenza l' alopecia areata risulta essere una patologia autoimmune e , come molte altre patologie a base autoimmune, la sua suscettibilità genetica è conferita da geni nella regione HLA con alcune differenze nella distribuzione etnica. Numerose associazioni sono state osservate tra l' alopecia areata e gli alleli DRB1*1104 o *0401 e la variante DQB1*0301 in particolare nell' AA universale o totale. Altri studi suggeriscono un ruolo per DQB1*0201, *0302 e *0303 nella suscettibilità per AA ed un' aumentata prevalenza di HLA-B12 è stata osservata nel fenotipo a chiazze.

Materiali e metodi.

Pazienti e controlli

Nello studio caso- controllo sono stati analizzati un totale di 295 soggetti di cui 85 affetti da alopecia areata (caso) e 210 sani (controllo). Gli 85 pazienti affetti da alopecia sono stati reclutati dal Dipartimento di Medicina Interna e Specialità

Mediche dell' università di Roma " Sapienza". La diagnosi di alopecia è stata posta in accordo a specifici criteri e la gravità della malattia è stata classificata in due gruppi in base all' estensione dell' alopecia in pz AA < 50% e cioè con parziale coinvolgimento del cuoio capelluto e pz AA > 50% con più della metà del cuoio capelluto interessato dalla perdita di capelli . I pazienti non presentano legami di familiarità tra loro e degli 85 pazienti 63 sono di sesso femminile e 22 di sesso maschile. È possibile, quindi, notare come la prevalenza di AA sia maggiore nei pazienti di sesso femminile con un rapporto F:M = 2,9 : 1. I pazienti hanno un' età media di $34 \pm 14,7$ anni.

Tra i 210 controlli, derivanti dallo stesso gruppo etnico, sono stati arruolati soggetti sani e cioè non affetti da nessuna patologia autoimmune; 90 di essi sono di sesso femminile e 120 di sesso maschile con un rapporto F:M = 1:1 e con età compresa in un range di $38 \pm 6,54$ anni.

Il consenso informato è stato ottenuto da ogni partecipante a questa ricerca.

Estrazione del DNA.

È stato eseguito nei soggetti analizzati un prelievo di sangue periferico. Esso è stato opportunatamente trattato per prevenire la contaminazione e quindi limitare l' errore pre-analitico ed è stato, poi, preparato in modo da determinare l' estrazione del DNA. Il DNA è stato estratto, da sangue venoso periferico usando una procedura specifica, già nota dalla fine degli anni '80, chiamata "salting out". Dal plasma ottenuto veniva aggiunto solfato d' ammonio, sostanza molto solubile in acqua, ma che non denatura le proteine. Esso è in grado di ridurre la solubilità delle proteine e quindi riesce a farle precipitare in modo da poter concentrare, desalificare e

recuperare il DNA in forma solida. Il solfato d' ammonio è composto da ioni salini che attirano le molecole di H₂O e quindi disidratano la componente proteica; le catene laterali idrofobiche delle proteine, intanto, si aggregano tra di loro senza che, però, vengano alterate e dal momento che il DNA è un acido, precipita per formazione di sali solubili . Questo sistema è molto utile perché gli aggregati precipitano solo grazie a queste interazioni di natura chimica senza dover essere centrifugate e, quindi, senza che su di esse vengano esercitate forze di tipo meccanico che ne altererebbero la struttura e la conservazione.

Tipizzazione degli HLA.

Tutti i campioni sono stati tipizzati usando un kit in commercio(Dynal Biotech Ltd, Bromborough, U.K.) e seguendo le istruzioni in esso contenute: sequence-specific oligo (SSO)-polymerase chain reaction (PCR) (INNO-LiPA®) per il gene HLA-DRB1 e il sequence specific primer (SSP)-PCR per l' allele HLA-DQB1.

Analisi statistica.

È stato eseguito dal sistema GenAEx 6 un test per valutare l' equilibrio di Hardy - Weinberg, un modello di studio della genetica delle popolazioni che postula che in una popolazione ideale vi sia l' equilibrio delle frequenze alleliche e genotipiche da una generazione all' altra; queste frequenze, quindi, non cambiano nel corso delle generazioni a meno che non intervengano fattori specifici atti a disturbare l' equilibrio stesso. La frequenza degli alleli e dei fenotipi è stata ottenuta dai pazienti e dai controlli attraverso una conta diretta e la loro distribuzione nei due gruppi è stata analizzata utilizzando il test di Fisher. Un P-value ≤ 0,05% è stato considerato statisticamente significativo. La correzione di Bonferroni è stata applicata per

adeguare i livelli di significanza dei confronti multipli. L' Odds ratio è stato calcolato secondo il metodo di Woolf e riportato solo quando il P-value del confronto corrispondente era significativo.

Risultati

Per studiare meglio gli alleli HLA -DQB1 e -DRB1 sono stati analizzati un totale di 295 soggetti di cui 85 affetti da alopecia areata (caso) e 210 sani (controllo). Degli 85 pazienti 63 sono di sesso femminile e 22 di sesso maschile. È possibile, quindi, notare come la prevalenza di AA sia maggiore nei pazienti di sesso femminile con un rapporto F:M = 2,9 : 1. I pazienti hanno un'età di $34 \pm 14,7$ anni. Tra i 210 controlli 90 sono di sesso femminile e 120 di sesso maschile con un rapporto F:M di circa 1 e la loro età è compresa in un range di $38 \pm 6,54$ anni; tra il fenotipo femminile e maschile di HLA- DQB1 e -DRB1 non c' erano differenze nella frequenza. La distribuzione del genotipo HLA- DQB1 e -DRB1 è risultata coerente con l' equilibrio di Hardy –Weinberg sia nei pazienti che nei controlli (dati non riportati). La tavola n° 1 elenca le frequenze dell' allele -DQB1 e -DRB1 sia nei pazienti affetti (caso) che nel controllo. La frequenza dell' allele DQB1 *03, codificante per la catena β dell' eterodimero DQ7 ed in seguito chiamato *03 (DQ7) era significativamente aumentata nei casi (39,7%) rispetto ai controlli (29,8%) [P = 0,016, OR = 1,53, 95% ed intervallo di confidenza(CI) = 1,06–2,22] mentre la frequenza dell' allele DQB1*06 era ridotta nei pazienti rispetto ai controlli (8,2% vs. 15,7%, P = $9,5 \cdot 10^{-3}$, OR 0,48, 95% CI 0,26–0,88). Osservando la distribuzione dell' allele DRB1 l' allele DRB1*13 era associato in modo negativo con la comparsa di malattia (P = $9,6 \cdot 10^{-3}$, OR 0,43, 95% CI 0,21–0,87) probabilmente a causa del forte linkage

disequilibrium con la variante allelica DQB1*06. L'allele DRB1*16 era più frequente nei casi di alopecia rispetto ai controlli ($P = 0,018$, OR 2,22, 95% CI 1,13–4,35). Quando i pazienti sono stati divisi, in base alla severità della perdita di capelli, in due gruppi (AA < 50% e AA > 50%) gli individui con un fenotipo più grave hanno mostrato una più alta frequenza della variante DQB1*03(DQ7) (46,0% AA > 50% vs. 29,8% controlli, $P = 4,5 \cdot 10^{-3}$, OR 2,01, 95% CI 1,22–3,31) e la più bassa percentuale dell'allele protettivo DQB1*06 (3,9% AA > 50% vs. 15,7% controlli, $P = 2,5 \cdot 10^{-3}$, OR 0,22, 95% CI 0,07–0,72). Non sono state osservate differenze nelle frequenze dell'allele DQB1 quando i due sottogruppi sono stati comparati anche se, come precedentemente esplicitato, un'alta prevalenza della variante DQB1*03(DQ7) ed un basso numero di alleli DQB1*06 sono stati osservati nel gruppo AA > 50% rispetto al gruppo AA < 50%. Tra gli alleli DRB1, il DRB1*16 era associato positivamente mentre l'allele DRB1*13 era associato negativamente con l'alopecia areata in pazienti colpiti da una maggiore perdita di capelli (13,2% AA > 50% vs. 4,8% dei controlli, $P = 8,9 \cdot 10^{-3}$, OR 3,03, 95% CI 1,36–6,76 e 3,9% AA > 50% vs. 12,6% dei controlli, $P = 0,015$, OR 0,28, 95% CI 0,09–0,93, rispettivamente). Inoltre la frequenza dell'allele DRB1*03 ($P = 0,039$, OR 0,18, 95% CI 0,02–1,34) e dell'allele DRB1*15 ($P = 0,014$, OR 0,14, 95% CI 0,02–1,05) è stata trovata più bassa in pazienti con AA > 50% rispetto ai controlli. Quest'ultimo allele inoltre ha una differente distribuzione statistica quando i due sottogruppi clinici sono stati comparati tra loro ($P = 7,0 \cdot 10^{-3}$, OR 0,10, 95% CI 0,01–0,80). Nessuno dei P-values significanti è sottostato alla correzione di Bonferroni per i test multipli (che regolano sette alleli DQB1 e tredici varianti DRB1) ad eccezione dell'associazione positiva DQB1*03(DQ7) e dell'associazione negativa DQB1*06 ritrovata in casi di AA > 50% ($P_c = 0,031$ e $P_c = 0,017$,

rispettivamente). La frequenza dell' allele -DQB1 e -DRB1 non divergeva statisticamente quando i sessi erano considerati separatamente sia nei casi che nei controlli (dati non riportati). Inoltre, come previsto dagli studi riportati in letteratura, non c' erano differenze significative nella presentazione clinica della malattia tra pazienti di sesso maschile e femminile (dati non riportati).

Dai nostri dati, abbiamo ottenuto le frequenze del fenotipo DQ7 e l' OR nell' intero gruppo di pazienti con alopecia comparato con l' intera popolazione dei controlli (Fig. 1): lo status DQ7 è stato molto più prevalente nei casi che nei controlli (65,9% vs. 49,5%, $P = 7,3 \cdot 10^{-3}$, OR 1,97, 95% CI 1,17–3,32).

È importante sottolineare che l' omozigosi dell' allele DQB1*03(DQ7) non incrementa il rischio per la comparsa di alopecia areata (dati non riportati).

Considerando lo status DR in relazione al DQ7 è stato possibile concludere che negli individui DQ7-positivi quasi tutti i soggetti erano DR11 positivi (46 /56 pazienti e 86 /104 controlli), come atteso sulle basi della conoscenza del linkage disequilibrium, e non è stata osservata differenza significativa tra i casi e i controlli nella distribuzione del DR (dati non riportati). Il fenotipo DQ7 non differisce statisticamente tra pazienti o controlli di sesso maschile e femminile (dati non riportati). La frequenza dello status DQ7 era significativamente aumentata fino al 76,3% negli individui gravemente affetti (AA > 50% vs. controlli, $P = 1,7 \cdot 10^{-3}$, OR 3,28, 95% CI 1,48–7,27).

È interessante, osservando il gruppo negativo per DQ7, notare un lieve aumento della prevalenza di DQ2 in tutti i soggetti affetti comparati con gli individui sani (65,5% pazienti vs. 45,3% controlli, $P = 0,042$, OR 2,30, 95% CI 0,98–5,40) ma questo

era più evidente nella comparazione dei casi affetti da una forma media di alopecia areata (70,0% AA < 50% vs. 45,3% controlli, P = 0,036, OR 2,82, 95% CI 1,00–7,90). Soprattutto nei pazienti negativi per DQ7, DQ2 era presente in due dei sei soggetti di sesso maschile (33%) e in diciassette dei ventitre soggetti femminili (74%) ma l' eccesso di casi nel sesso femminile non era significativo, forse a causa della dimensione del campione.

Discussione

Questo è il primo studio che investiga gli alleli dell' HLA di classe II a livello molecolare nei pazienti italiani affetti da alopecia areata. Uno studio precedente effettuato da Orecchia et al. riporta una aumentata frequenza dell' antigene DQ3 nei casi di alopecia areata ma la ricerca era stata compiuta utilizzando soltanto analisi sierologiche. Infatti le molecole DQ3 comprendono tre differenti sierotipi codificati da diversi gruppi di alleli DQB1*03 che sono: DQ7, DQ8 e DQ9.

Usando un approccio caso- controllo abbiamo trovato che solo l' allele DQB1*03, sierologicamente equivalente all' eterodimero DQ7, era un marker di suscettibilità per l' alopecia areata nella popolazione italiana, mentre è interessante valutare come la prevalenza delle varianti *03(DQ8) e *03(DQ9) non differisca significativamente tra i casi e i controlli. L' allele DQB1*03(DQ9) era stato associato ad un decorso negativo perchè era meno prevalente nei casi di alopecia areata che nei controlli ma il paragone non era significativo probabilmente a causa delle dimensioni del campione. Nella nostra analisi abbiamo osservato che gli individui affetti sono, portatori dell' allele DQB1*03(DQ7) e che esso raggiunge una più importante associazione nei pazienti con una più grave estensione della

patologia(OR 2,01). Inoltre l' identificazione di DQB1 che differenzia *03(DQ7) dagli altri sottotipi *03 è fondamentale nella definizione del rischio genetico di alopecia areata. Infatti la positività a DQ7 è associata al maggior rischio genetico, senza differenze di sesso, per lo sviluppo di alopecia areata fino a raggiungere un OR di 3,28 quando i casi di AA > 50% erano comparati con i controlli. L' associazione positiva di DR5 (DR11) riportata da Orecchia et al. può essere spiegata dal forte linkage disequilibrium tra l' allele DQB1*03(DQ7) e DRB1*11, spesso ritrovata nell' aplotipo DRB1*11-DQA1* 05-DQB1*03(DQ7) in Italia. Nel nostro studio non abbiamo trovato un' aumentata prevalenza della variante DRB1*04, riportata in altre popolazioni, probabilmente a causa della minor frequenza della combinazione allelica DRB1*04-DQA1*03 DRB1*03(DQ7) a conferma che l' associazione genetica della regione HLA di classe II è ristretta al gene HLA-DQB1. L' associazione tra lo status DQ7 e l' alopecia areata potrebbe essere spiegata dal fatto che la distruzione del follicolo pilifero mediata dalle cellule T CD8+ potrebbe essere principalmente guidata dai linfociti CD4+ legati alle APCs che sono portatrici degli eterodimeri DQ7. Inoltre, il ruolo conosciuto per le cellule CD4+ nell' estensione della malattia potrebbe essere plausibile alla luce della più frequente presenza delle cellule DQ7 positive. È interessante notare che l' allele HLA-DQB1*03(DQ7) codifica per una catena β che trasporta un acido glutamico, un aminoacido polare con una catena laterale di carica negativa, in posizione Glu45 in uno dei due domini extracellulari (IMGT /HLA database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Questo aminoacido, diversamente dalla glicina, un aminoacido non polare con una catena laterale neutra che è localizzata nella stessa posizione in tutte le altre varianti DQB1, potrebbe correlare con una precisa funzione delle molecole DQ7 ed esplicitare l'

associazione genetica con l' alopecia areata essendo direttamente coinvolta nella patogenesi della malattia.

Abbiamo osservato inoltre che, solo in assenza del fenotipo DQ7, c' era stato un aumento della percentuale dello stato DQ2 significativamente evidente nei pazienti (OR 2,30) e principalmente nei casi con AA < 50% (OR 2,82). Un' associazione positiva dell' allele DQB1*02 codificante per la catena β delle molecole DQ2, è stata riportata da Barahmani et al. nell' intero gruppo di pazienti affetti da alopecia areata. In generale non sembrano esserci relazioni tra sesso ed alopecia areata in quanto l' odds complessivo non era statisticamente differente, anche quando un' aumentata prevalenza del fenotipo DQ2 nelle pazienti DQ7-negative era evidente. Nella nostra analisi abbiamo mostrato che DQB1*06, anche nella popolazione italiana, è associato negativamente con l' alopecia areata mostrando un OR molto basso (0,22) nei pazienti con alopecia estesa. Inoltre non è stata osservata alcuna differenza significativa nella distribuzione degli alleli DRB1 e dei fenotipi da esso derivanti dopo una correzione per una comparazione multipla, la frequenza dell' allele DRB1*13 mostra un trend di diminuita frequenza tra i pazienti se confrontati con i controlli. Poiché l' allele DRB1*13 è in forte linkage disequilibrium con la variante DQB1*06, si è pensato che DRB1*13-DQB1*06 potrebbe essere considerato come un aplotipo protettivo contro l' insorgenza della malattia.

In conclusione i risultati di questo studio forniscono un' evidenza in più all' ipotesi che il polimorfismo DQ moduli le probabilità di insorgenza dell' alopecia. In particolare nella popolazione italiana come nelle altre popolazioni dell' etnia caucasica l' allele HLA-DQB1*03, sierologicamente relazionato alle molecole DQ7,

ha il ruolo più importante nel conferimento della predisposizione all' insorgenza dell' alopecia areata mentre l' allele DQB1*06 è una variante protettiva soprattutto nei casi associati ad un' importante perdita di capelli. Inoltre il significato diagnostico del test dell' HLA per l' alopecia areata non era assoluto; la tipizzazione di DQB1 potrebbe avere implicazioni cliniche, nell' identificazione di individui che hanno una predisposizione genetica allo sviluppo di alopecia areata, specialmente tra i gruppi a rischio come i familiari di I grado dei pazienti. Inoltre la forte associazione tra DQB1*03(DQ7) e le forme più severe di alopecia sembrano validare la finalità prognostica del test genetico nei pazienti con alopecia areata.

Tabella 1

Allele	All patients, n = 85		Controls, n = 210		AA < 50%, n = 47		AA > 50%, n = 38	
	n	%	n	%	n	%	n	%
DQB1*02	35	20.6	85	20.2	24	25.5	11	14.5
DQB1*03(DQ7)	67	39.4 ^a	125	29.8	32	34.0	35	46.0 ^c
DQB1*03(DQ8)	6	3.5	18	4.3	2	2.1	4	5.3
DQB1*03(DQ9)	3	1.8	18	4.3	0	—	3	3.9
DQB1*04	5	2.9	8	1.9	4	4.2	1	1.3
DQB1*05	40	23.5	100	23.8	21	22.3	19	25.0
DQB1*06	14	8.2 ^b	66	15.7	11	11.7	3	3.9 ^d
DRB1*01	8	4.7	33	7.8	4	4.3	4	5.3
DRB1*03	8	4.7	29	6.9	7	7.4	1	1.3 ^e
DRB1*04	12	7.1	31	7.4	3	3.2	9	11.8
DRB1*07	28	16.5	67	15.9	17	18.1	11	14.5
DRB1*08	5	2.9	7	1.7	4	4.3	1	1.3
DRB1*09	2	1.2	2	0.5	0	—	2	2.6
DRB1*10	2	1.2	6	1.4	1	1.1	1	1.3
DRB1*11	53	31.2	101	24.0	27	28.7	26	34.2
DRB1*12	5	2.9	10	2.4	3	3.2	2	2.6
DRB1*13	10	5.9 ^e	53	12.6	7	7.4	3	3.9 ^h
DRB1*14	8	4.7	25	5.9	3	3.2	5	6.6
DRB1*15	12	7.1	36	8.6	11	11.7	1	1.3 ⁱ
DRB1*16	17	10.0 ^f	20	4.8	7	7.4	10	13.2 ^j

OR, odds ratio; CI, confidence interval; P_c, P-value corrected for multiple testing (the P-value was corrected for seven comparisons for DQB1 alleles and for 13 comparisons for DRB1 variants); ns, not significant. ^aAll patients vs. controls: P = 0.016, P_c = ns, OR 1.53, 95% CI 1.06–2.22. ^bAll patients vs. controls: P = 9.5 × 10⁻³, P_c = ns, OR 0.48, 95% CI 0.26–0.88. ^cAA > 50% patients vs. controls: P = 4.5 × 10⁻³, P_c = 0.031, OR 2.01, 95% CI 1.22–3.31. ^dAA > 50% patients vs. controls: P = 2.5 × 10⁻³, P_c = 0.017, OR 0.22, 95% CI 0.07–0.72. ^eAll patients vs. controls: P = 9.6 × 10⁻³, P_c = ns, OR 0.43, 95% CI 0.21–0.87. ^fAll patients vs. controls: P = 0.018, P_c = ns, OR 2.22, 95% CI 1.13–4.35. ^gAA > 50% vs. controls: P = 0.039, P_c = ns, OR 0.18, 95% CI 0.02–1.34. ^hAA > 50% vs. controls: P = 0.015, P_c = ns, OR 0.28, 95% CI 0.09–0.93. ⁱAA > 50% vs. controls: P = 0.014, P_c = ns, OR 0.14, 95% CI 0.02–1.05; and AA < 50% vs. AA > 50%: P = 7.0 × 10⁻³, P_c = ns, OR = 0.10, 95% CI 0.01–0.80. ^jAA > 50% vs. controls: P = 8.9 × 10⁻³, P_c = ns, OR = 3.03, 95% CI 1.36–6.76.

Figure 1

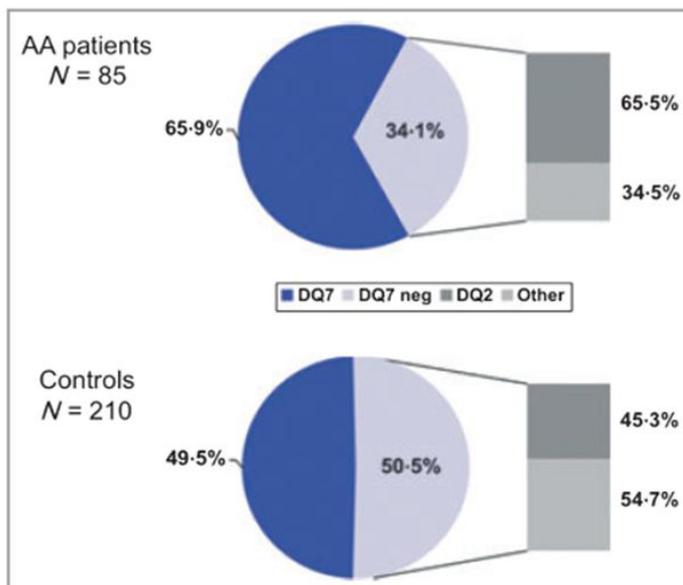


Fig 1. HLA-DQ7-positive and -negative individuals among patients with alopecia areata (AA) and healthy controls. Among DQ7-negative individuals, DQ2 status is shown.

Foxp3 e ICOSLG: varianti alleliche nei pazienti con alopecia areata.

L' alopecia areata (AA), una patologia autoimmune che colpisce il follicolo pilifero nella fase anagen, è caratterizzata da un diminuito numero di linfociti T regolatori (Treg) CD4+/CD25+. I linfociti CD4+, che esprimono il fattore di trascrizione forkhead box protein 3 (Foxp3), hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento della tolleranza periferica attraverso l' inibizione dell' espansione e della funzione delle cellule effettrici T effettori citotossiche. Il ligando costimolatorio inducibile (ICOSLG) agisce come un segnale costimolatorio per la proliferazione delle cellule T, la secrezione citochinica e la proliferazione delle cellule B.

Con questo studio abbiamo mostrato che rs2294020 -3675(G) [P 0.003, OR (95% CI): 0.4 (0.2-0.7)] e rs378299 -509(T) [P 0.014, OR (95% CI): 0.5 (0.2-0.8)], i due SNPs dei due alleli nella regione regolatoria a monte di FOXP3 e ICOSLG rispettivamente, sono associati con l' alopecia areata. Gli esperimenti sull' espressione genetica hanno mostrato che gli alleli rs2294020 -3675(G) e rs378299 -509(T) sono in grado di modulare i livelli trascrizionali di questo gene. I nostri dati rivelano in modo completo che il polimorfismo rs2294020 di Foxp3 e la variante rs378299 nel gene ICOSLG sono associate con una minore espressione dei geni FOXP3 e ICOSLG .

In questo studio è stata valutata la possibilità che un single nucleotide polymorphism (SNP) dei geni FOXP3 (rs2294020) e ICOSLG (rs378299) sia localizzato nella regione promotrice dei rispettivi geni che vengono selezionati a causa della loro alta frequenza nella popolazione italiana (GenBank UCSC). Infatti, i nostri studi recenti, tesi ad evidenziare la correlazione tra il locus HLA-DQB1 e la comparsa di

alopecia areata nella popolazione italiana, hanno evidenziato il ruolo di DQB1*03(DQ7) come allele predisponente per la patologia e, inoltre, hanno fornito ampia risonanza ai test genetici nel management dell' alopecia areata. Sulla base di queste conoscenze sono stati condotti ulteriori studi per conoscere la correlazione tra l' allele HLA di tipo II DQB1*03(DQ7) e i SNP dei geni FOXP3 rs2294020 e ICOSLG rs378299. Abbiamo quindi ricercato il significato funzionale della presenza dei polimorfismi nel gene Foxp3 e nel gene ICOSLG attraverso la quantificazione dell' espressione dell' mRNA nel sangue periferico di pazienti affetti da alopecia areata attraverso uno studio di tipo caso-controllo.

Materiali e metodi

Pazienti e controlli

Sono stati studiati 204 soggetti tra cui 120 pazienti affetti da alopecia areata e 84 controlli sani. Dei 120 pazienti affetti da alopecia 93 erano di sesso femminile e 27 di sesso maschile con un età compresa tra i 7 e i 60 anni caratterizzati clinicamente da alopecia areata (43 soggetti), da alopecia universale (48 soggetti) e da alopecia totale (28 soggetti). Degli 84 controlli 60 erano di sesso femminile e 24 di sesso maschile con un' età compresa tra i 15 e i 75 anni.

I pazienti sono stati reclutati dal Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche dell' università di Roma La Sapienza e dall' Associazione Nazionale Alopecia Areata (ANAA) e per ciascuno di essi la diagnosi è stata formulata secondo specifici criteri diagnostici e campioni di sangue venoso periferico sono stati raccolti da pazienti e dai controlli sani.

Il consenso informato è stato ottenuto per ciascun paziente.

Genotipizzazione e analisi tramite sequenziamento dei prodotti della polymerase chain reaction (PCR).

Il DNA è stato estratto dalle cellule di sangue periferico attraverso un kit di estrazione (Qiagen, Hilden, Germany). La regione promotrice del gene del gene FOXP3 e ICOSLG contengono rispettivamente il SNPs rs2294020 (A-3675G) e rs378299 (C-509T), sono stati amplificati usando primers specificatamente creati per amplificare la regione genetica compresa tra la regione genetica -3605 e -3925 per quanto riguarda il gene FOXP3 e la sequenza da -229 a -566 per il gene ICOSLG. Le condizioni per il gene FOXP3 e ICOSLG sono state ottimizzate usando diverse concentrazioni di magnesio e temperature diverse. Il DNA genomico (100ng) è stato ottenuto in ogni reazione PCR. I prodotti della PCR sono stati poi purificati dai primers con Ultra Clean PCR Clean-up Sample Kit (CABRU), sono stati sequenziati usando automaticamente ABI Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), e analizzati su un ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) secondo i protocolli del produttore. I parametri usati per l' amplificazione sono stati 34 cicli a 94 °C per 30 s, 60 °C per 30 s, 72 °C per 60 s.

Tipizzazione dell' HLA

Tutti gli individui sono stati tipizzati per il gene HLA-DRB1 dall' amplificazione PCR con primer sequenze- specifiche usando kit commerciali seguendo le istruzioni del produttore (DynaL Biotech Ltd, Bromborough, U.K.): sequence-specific oligo (SSO)-polymerase chain reaction (PCR) (INNO-LiPA®) per il gene HLA-DRB1 e le sequence specific primer (SSP)-PCR per gli alleli HLA-DQB1.

Analisi dell' espressione dei geni FOXP3 e ICOSLG.

Venticinque pazienti e venti controlli sani sono stati reclutati per l' analisi dell' espressione genetica. Le cellule mononucleari di sangue periferico (PBMC) sono state isolate dal sangue venoso eparinizzato da una centrifugazione di densità standard Ficoll-Hypaque (Biochrom). L' espressione genetica di FOXP3 e ICOSLG è stata analizzata con la PCR e con la PCR Real Time (PCR-RT) come segue: 48 µl di RNA totale, isolato usando il kit di isolamento OMNIZOL RNA (EuroClone), sono stati trattati con 6 U di DNasi I e trascritti in cDNA usando Oligo (dT) 20Primer e Superscript II Reverse Transcriptase, seguito dalla H digestione dell' RNasi. I saggi di PCR sono stati poi effettuati in un volume finale di 25 µl usando 1 U DREAMTaq DNA Polymerase (Fermentas), 600 nM per ogni primer, 250 µM dNTP (MBI Fermentas), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂. L' amplificazione è stata eseguita in un Thermalcycler (PTC-100; MJ Research) in condizioni standard: un singolo processo di denaturazione a 94 °C per 3 min seguito da altri 35 per ICOSLG, 30 cicli a 94°C per 1 min poi 54–62°C 1 min e 72°C per 2 min seguito da un processo a 72°C per 10 min per FOXP3 e GAPDH. Sono state usate le seguenti coppie di nucleotidi (senso e antisenso): FOXP3, 5'-TGA^{CT}TGTCTGTATACTCTTG-3' e 5'-TTTGCATGGTTCCACCTATCC-3'; ICOSLG, 5' -GCTCCGATGATCTCCAGGACTT -3' e 5'GTGCAGCCTTTCCCAAACCAGC -3'; GAPDH, 5'-GAGCAACAGGAAGTGGCTGTG-3' e 5'-TAATGCTTCCAGTTTACAAGTGGT-3'. Per ottenere misure quantitative dell' espressione dei geni di Foxp3 e ICOSLG è stata utilizzata una PCR Real Time usando il termociclo LightCycler e il SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics). Gli stessi primers sono stati usati per la PCR Real Time. I prodotti delle reazioni sono stati separati su un gel di agarosio all'1.2% in TAE(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) che

contiene SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). i prodotti della PCR per FOXP3 e ICOSLG sono stati confermati da un' analisi di sequenza. L' espressione del cDNA è stata normalizzata per l' espressione di GAPDH.

Analisi statistica

Le differenze statistiche significative tra le frequenze dei genotipi sono state valutate usando analisi come il test di Fisher per le variabili binarie e la t di Student per le variabili continue. L' Odds ratio (ORs) e l' intervallo di confidenza (CIs) al 95% sono stati calcolati ed è stato considerato statisticamente significativo un p value minore dello 0.05%. Le analisi sono state condotte usando SPSS 13.0 e Graphpad Prism 4 softwares. Le analisi dei dati della PCR quantitative sono state basate su un valori 2-ddCT.

Risultati

La frequenza dei SNPs rs2294020 FOXP3 e rs378299 ICOSLG nei pazienti affetti da alopecia areata confrontati con i controlli. La frequenza dei SNPs rs2294020 e rs378299 localizzati nella regione promotrice dei geni FOXP3 e ICOSLG, rispettivamente, sono state analizzate sia nei pazienti che nei controlli. Non sono state osservate deviazioni dall' equilibrio di Hardy-Weinberg per i siti polimorfici (dati non mostrati). I soggetti portatori del SNP potrebbero avere un genotipo variante per l'eterozigosi o per l' omozigosi che corrisponde al genotipo (A/G) o (G/G) per rs2294020 e il genotipo (C/T) o (T/T) per rs378299 SNP rispettivamente.

Per ogni SNP il genotipo eterozigote e omozigote considerati sono più frequenti nei pazienti affetti da omozigosi che nei controlli. Per verificare la dipendenza della frequenza del SNPs rs2294020 e rs378299 sulle variabili indipendenti come l'età, il sesso e il tipo di alopecia, abbiamo eseguito un'analisi invariata che non mostra nessuna associazione statistica significativa (dati non mostrati). Inoltre non abbiamo trovato alcuna relazione genetica tra ognuno di questi SNPs e la frequenza di altre patologie autoimmuni (tiroidite, morbo celiaco, dermatite allergica, psoriasi) che si presentano in associazione all'alopecia areata in alcuni pazienti affetti.

1. La frequenza della co-associazione dei SNPs rs2294020 and rs378299 nel genoma dei pazienti e dei controlli.

Dal momento che ognuno dei due SNPs studiati risultano associati con l'alopecia areata ci siamo chiesti perché la coeredità dei due SNP nei genomi singoli potrebbe essere un evento più frequente nei pazienti che nei controlli. Definiamo come GT la combinazione genotipica presente in soggetti portatori dell'allele rs2294020 -3675(G) e rs378299 -509(T). La frequenza GT era significativamente più alta nei soggetti con Alopecia Areata (22%) che negli individui sani (7%, $P = 0.05$). Non sono state ritrovate differenze significative dal punto di vista statistico per i pazienti e i controlli quando tutte le altre possibili combinazioni genetiche erano considerate

2. Associazione degli alleli DQB1*03 con FOXP3 rs2294020 -3675(G) e ICOSLG rs378299 -509(T)

Abbiamo analizzato l'associazione tra l'allele DQB1*03, codificante per l'eterodimero DQ7, e gli alleli rs2294020 -3675(G) di FOXP3 e rs378299 -509(T) di ICOSLG. È stata definita la combinazione genotipica GT*03 che è presente nei

soggetti portatori dell' allele HLA DQ B1*03 e di rs2294020 -3675(G) rs378299 -509(T). La frequenza del genotipo GT*03 era significativamente più alta nei soggetti affetti da alopecia areata (17%) piuttosto che negli individui sani (5%, P =0.04). Non sono state ritrovate differenze significative tra i pazienti e i controlli quando tutti le altre combinazioni possibili di genotipi erano considerate.

3. Gli alleli FOXP3 rs2294020 -3675(G) e ICOSLG rs378299 -509(T) correlano con una ridotta espressione di FOXP3 e ICOSLG.

Dal momento che gli SNPs rs2294020 e rs378299 sono localizzati nella regione promotrice dei geni FOXP3 e ICOSLG è ragionevole ipotizzabile che modulino la relativa espressione genica. Infatti abbiamo analizzato i livelli di mRNA di FOXP3 e ICOSLG nel sangue periferico dei pazienti affetti da alopecia areata e nei controlli, portatori e non degli alleli -3675(G) o -509(T) dei geni FOXP3 o ICOSLG rispettivamente. L' espressione dell' mRNA di FOXP3 o ICOSLG era significativamente più basso in soggetti (sia i pazienti che i controlli) portatori dell' allele rs2294020 -3675(G) e rs378299 -509(T) rispetto ai soggetti portatori dei reciproci alleli rs2294020 -3675(A) e rs378299 -509(C) (Figura 2). Infatti l' espressione dei trascritti di FOXP3 o ICOSLG era più bassa nei pazienti piuttosto che nei controlli e questo era associato con la presenza delle rispettive varianti alleliche -3675(G) e -509(T).

Discussione

In questo lavoro abbiamo trovato forti evidenze per le correlazioni tra le specifiche varianti nei geni FOXP3 e ICOSLG che risultano in una diminuita espressione di FOXP3 e ICOSLG ed aumentano il numero delle cellule T Foxp3+CD4+ CD25+CD127+

nel sangue venoso periferico. Abbiamo investigato l'associazione dei SNP di rs2294020 del gene FOXP3 e dei SNP di rs378299 del gene ICOSLG con l'alopecia areata. È importante sottolineare, negli individui affetti, la bassa espressione del gene FOXP3 e ICOSLG è particolare. I risultati mostrano che la frequenza del genotipo G/G per i SNP rs2294020 e del genotipo T/T per i SNP rs378299 sono significativamente aumentati nei pazienti con alopecia areata rispetto ai controlli. Abbiamo eseguito sia l'analisi di regressione logistica binaria che l'analisi di stratificazione di genere. Un'alta frequenza della combinazione genotipica -3675(G)-509(T) è stata osservata nei pazienti con alopecia areata. L'analisi binaria della regressione logistica ha mostrato che non c'erano differenze statistiche tra pazienti e controlli ed esse sono state adeguate per il sesso e il tipo di alopecia. Questi risultati suggeriscono l'esistenza di un'associazione positiva tra gli SNP analizzati e l'alopecia areata confermando il ruolo dei fattori genetici nella patogenesi della malattia. Il fattore di trascrizione FOXP3 è stato identificato come il maggior marker e regolatore funzionale dello sviluppo e della funzione delle cellule T regolatorie. In una serie di studi basati su modelli murini e sugli umani gli studiosi hanno mostrato che la mutazione nel gene Foxp3 è stata collegata alle manifestazioni autoimmuni. Poiché l'alopecia areata è una patologia autoimmune abbiamo testato come essa sia associata con Foxp3 e, contemporaneamente, abbiamo investigato la correlazione tra gli SNP di rs2294020 e rs378299 con l'espressione dei geni Foxp3 e ICOSLG nei pazienti affetti da alopecia areata e nei controlli sani nella popolazione italiana. È stato riportato che rs2294020 e rs378299 sono due polimorfismi funzionali nella regione promotrice a monte del gene Foxp3 e ICOSL rispettivamente e causano una diminuita trascrizione nei soggetti portatori di alleli a rischio per l'

alopecia areata. Numerosi studi hanno rivelato che Foxp3 agisce come un gene target per lo sviluppo e la maturazione dei Treg. Studi dello stesso tipo per malattie diverse in popolazioni diverse, come ad esempio lo studio nella popolazione giapponese dei SNPs del FOXP3/Scurfin nella regione promotrice (rs3761548, rs2232364, rs2232365) hanno mostrato che essi conferiscono una significativa suscettibilità per il diabete mellito di tipo 1. Gao e coll hanno mostrato che il polimorfismo del promotore -3279 A/C relativo alla traslazione del sito di partenza è associato con un aumentato rischio di psoriasi nella popolazione cinese. Il SNP nella regione promotrice potrebbe alterare potenzialmente l' espressione genetica attraverso cambiamenti nella specificità di legame ai loro siti target e modifica la cinetica dell' iniziazione della trascrizione. Poiché l' analisi dell' aplotipo si serve di un numero determinato di markers, essa potrebbe fornire ulteriori informazioni sulla suscettibilità del gene alla malattia. Sono richiesti studi che usano molti SNPs per ottenere l' esatta associazione di Foxp3 e ICOSL con l' alopecia areata. Abbiamo mostrato che le varianti dei SNP rs2294020 e rs378299 SNPs localizzati nella regione promotrice a monte di Foxp3 e ICOSL hanno un' influenza sui livelli di trascrizione probabilmente incrementando la suscettibilità alla malattia ma ulteriori studi sono richiesti per spiegare meglio questa tesi. L' associazione tra l' allele DQB1*03 e le varianti genetiche rs2294020 -3675(G) FOXP3 e rs378299 -509(T) ICOSLG suggeriscono che l' allele DQB1*03, codificante l' eterodimero per DQ7, potrebbe andare ad inficiare l' attività delle cellule T reg CD4+CD25+FOXP3+ in pazienti affetti da alopecia areata. Inoltre la comprensione del meccanismo che regola la responsività delle citochine e la differenziazione delle Treg potrebbe aiutare nello sviluppo di terapie genetiche.

Figura 2

Espressione dell' analisi di FOXP3 and ICOSLG in pazienti con alopecia areata portatori dell' allele rs2294020 -3675(G) e rs378299 -509(T) (barre blu) e in paziente portatori dell' allele rs2294020 -3675(A) e rs378299 -509(C) (barre rosse) attraverso Real Time PCR. Ogni saggio è stato eseguito in duplicato. L' espressione dell' mRNA expression è stata normalizzata ai livelli di GAPDH

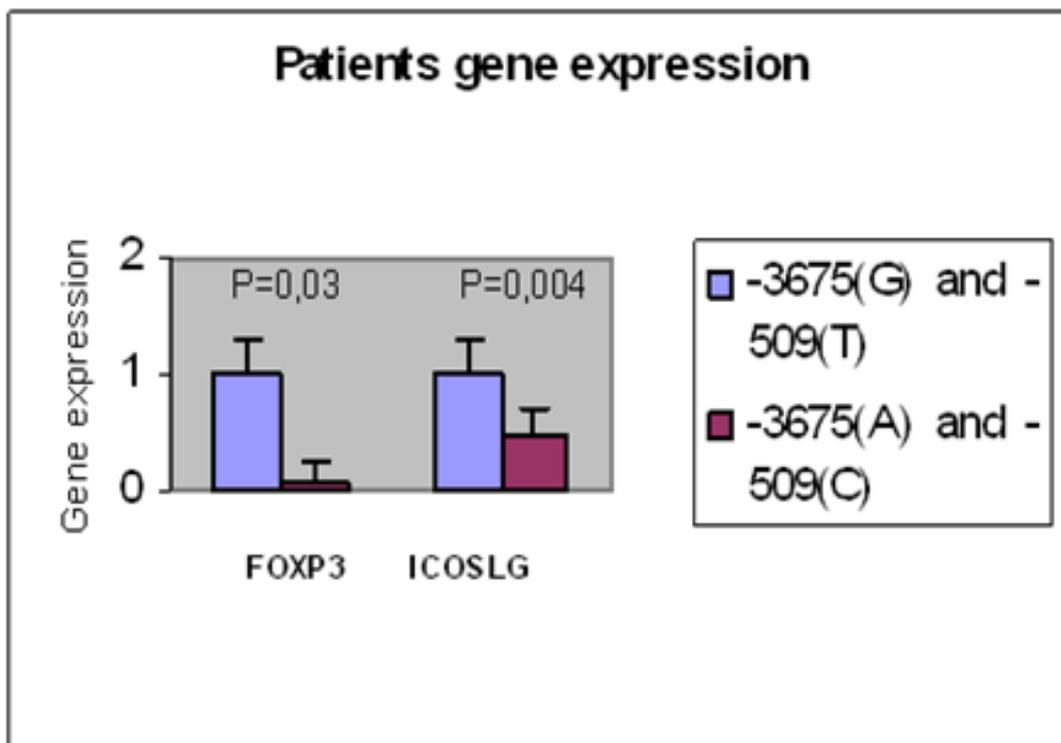
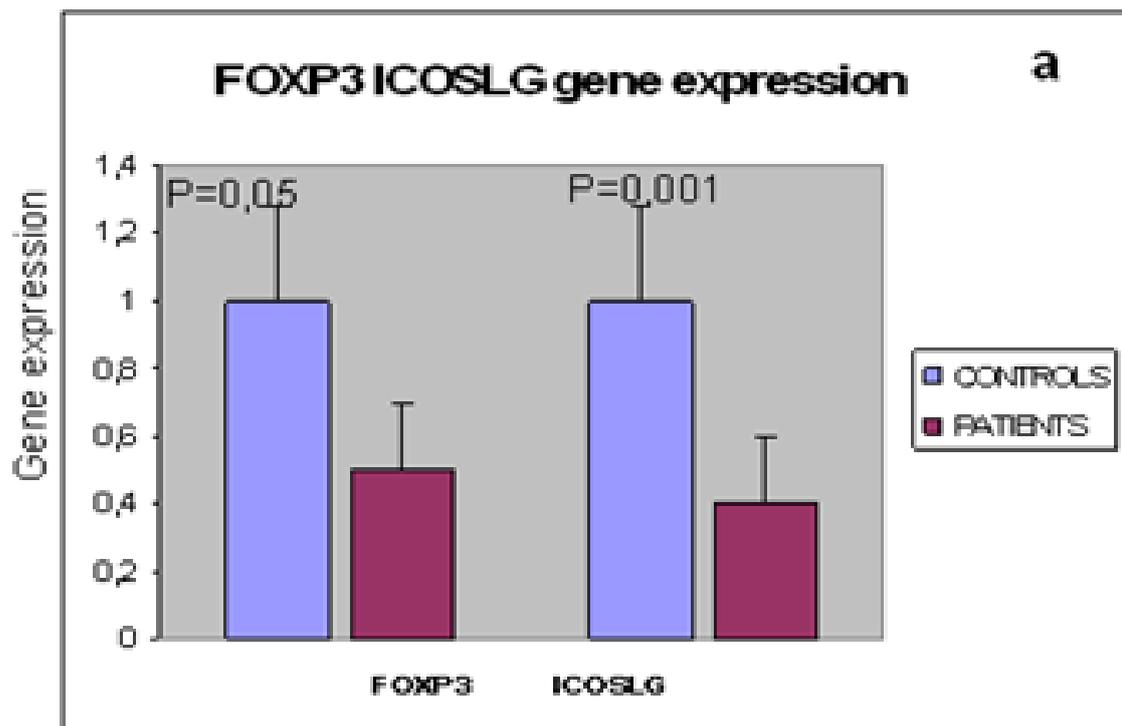
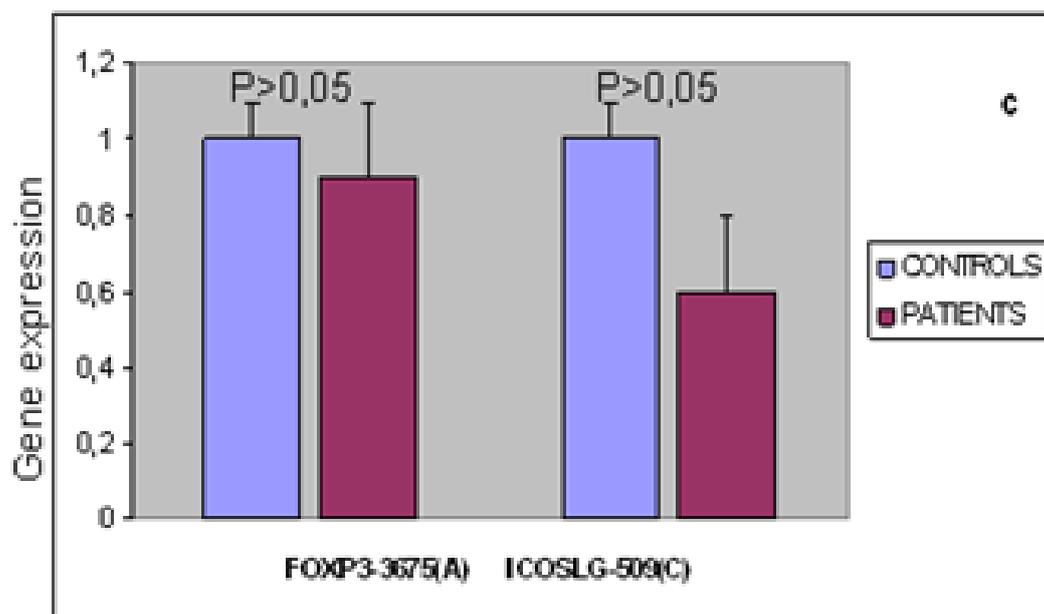
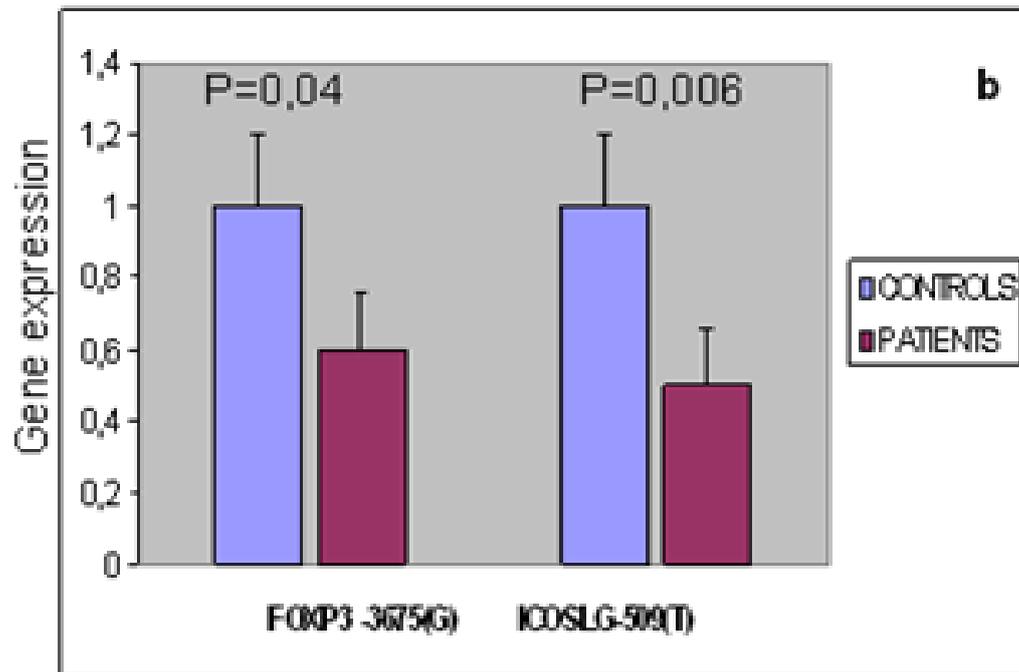


Figura 3.a)analisi dell' espressione di FOXP3 and ICOSLG in pazienti con alopecia areata (barre rosse) e in controlli sani (barre blu); b) espressione di FOXP3 e ICOSLG in rs2294020 -3675(G) e rs378299 -509(T) pazienti e controlli sani; c)espressione di FOXP3 and ICOSLG in rs2294020 -3675(A) e rs378299 -509(C)pazienti e controlli sani. L' espressione di FOXP3 e ICOSLG è stata misurata tramite Real Time PCR and normalizzata per l' espressione di GAPDH. L' espressione di FOXP3 e ICOSLG è stata calcolata come $2^{-\Delta\Delta CT}$, dove CT è il ciclo soglia. Real-time PCRs sono state eseguite in duplicato..





Studio dei polimorfismi genici +49 AG e CT60 di CTLA4 nella popolazione italiana.

Sono stati valutati due SNP del gene per CTLA4 per la loro potenziale associazione con l' alopecia areata nella popolazione italiana usando un approccio di studio di tipo caso-controllo. Sono stati genotipizzati, attraverso la metodica polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), le varianti alleliche +49AG (rs231775) e CT60 (rs3087243) in 130 pazienti e in 189 controlli sani. Il gruppo dei pazienti è stato diviso in due gruppi a seconda della percentuale di manifestazione della malattia (<50% e >50% fino alla forma totale o universale). Come precedentemente detto la proteina CTLA4 ha un ruolo importante nella regolazione negativa della proliferazione cellulare sia per quanto riguarda la prevenzione dell' attivazione della risposta, da parte delle cellule T contro il self, sia per quanto riguarda l' attenuazione della risposta cellulare dopo l' attivazione. Esso è inoltre coinvolto nel mantenimento della tolleranza immunitaria e le sue alterazioni possono condurre alla comparsa di patologie autoimmuni. Nella regione cromosomica associata al gene per CTLA4 sono state ritrovati molti SNP (più di 100) e molte varianti sono state associate alla comparsa di malattie autoimmuni come: celiachia, diabete mellito di tipo 1, morbo di Graves, sindrome di Sjögren ed artrite reumatoide anche se alcune di esse non sono state confermate e molti dati contrastanti sono derivati dallo studio di diverse popolazioni. Un' associazione simile è stata sospettata anche per quanto riguarda l' alopecia areata. John e coll. hanno dimostrato come ci fosse una forte associazione tra la variazione missense +49AG (rs231775), che si esprime con la sostituzione dell' aminoacido treonina con l'

alanina al codone 17 nel peptide (T17A) e per il dimorfismo CT60(rs3087243) che è localizzato 236 bp a valle del CTLA4. Il presente studio è volto ad analizzare l'associazione di queste due variazioni nella popolazione italiana.

Materiali e metodi

Sono stati studiati 130 pazienti affetti da alopecia areata e 189 controlli. I pazienti affetti sono stati divisi in base alla percentuale di manifestazione della patologia in due gruppi: AA < 50% e AA > 50%. I pazienti sono stati reclutati dal Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche dell'Università di Roma La Sapienza e per ciascuno di essi la diagnosi è stata formulata secondo i specifici criteri diagnostici e sono stati raccolti campioni di sangue periferico. Il consenso informato è stato ottenuto da ogni partecipante a questa ricerca.

Il DNA è stato estratto dal sangue venoso periferico usando la tecnica del salting out mentre la tipizzazione dell'HLA-DQB1 è stata ottenuta attraverso PCR-SSP (sequence-specific primer) kit di tipo Dynal (Invitrogen). Tutti gli individui sono stati genotipizzati per i polimorfismi del CTLA4 usando il metodo PCR-RFLP. Il SNP +49AG (rs231775) nell'esone 1 del gene CTLA4 è stato analizzato come precedentemente descritto. Un frammento di 152 bp è stato amplificando usando i primers per 49AG (5'-AAGGCTCAGCTGAACCTGGT-3') e la 49AG-reverse 5'-CTGCTGAAACAAATGAAACCC-3', ad una temperatura di 62°C. Il primer precedentemente detto è portatore di un mismatch di singola base nell'ultimo nucleotide (corrispondente alla posizione +47) che crea un sito di restrizione BstEII nell'allele A. I prodotti amplificati sono stati digeriti con 5 unità di BstEII (New England Biolabs, Beverly, MA) a 60°C e i frammenti sono stati visualizzati con

elettroforesi su gel di agarosio a 3.5% . L' allele G produce un frammento intatto di 152 bp mentre l' allele digerito A risulta in una banda di 130 bp. I prodotti della PCR comprendente lo SNP CT60 sono stati ottenuti usando i primers per CT60 (5'-ATCTGTGGTGGTCGTTTTCC-3') e il CT60-reverse 5-CCATGACAACGTGAATGCCTGT-3' ad una temperatura di 58°C. la digestione è stata effettuata a 37°C usando 5 unità di HpyCh4IV (New England Biolabs, Beverly, MA). L' enzima di restrizione taglia l' amplicon di 382 bp solo se è presente l' allele G dando vita a frammenti di 252 e 130 bp. I prodotti digeriti sono stati analizzati su un gel di agarosio al 2%.

Analisi statistica

Le frequenze dell' allele CTLA4, i genotipi e gli aplotipi nei pazienti e controlli sono stati ottenuti dal programma SHESIS e la distribuzione nei due gruppi è stata comparata usando il test di Fisher. Una p value <0.05 è stata considerata statisticamente significativo. L' equilibrio di Hardy-Weinberg è stato calcolato usando il software GenAEx 6. L' Odds Ratios (ORs), usato per misurare l' associazione tra la frequenza allelica e l' alopecia areata, è stato ottenuto in accordo con il metodo di Woolf e riportato solo quando la p dei confronti corrispondenti risultava significativa. Considerando la prevalenza riportata della variante +49G pari al 37% e la prevalenza dell'allele CT60 G pari al 54%[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>], la dimensione del campione usata in questo studio è stata sufficiente per ritrovare infine un rischio aumentato di 1.7 volte per lo sviluppo di AA con un potere statistico del 70% ad un livello di significatività pari al 5%.

Risultati

La frequenza degli alleli G di +49AG e dei polimorfismi CT60 nella popolazione dei controlli è risultata perfettamente in linea con quelle, riguardanti un gruppo di controlli sani italiani, riportate da Viganò et al. e Brozzetti et al. la distribuzione del genotipo di CTLA4 +49AG e CT60 è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg sia nei pazienti che nei controlli e non differiva in modo significativo nei pazienti e nei controlli (dati non mostrati). Nella tavola 1 sono elencati gli alleli e le frequenze genotipiche di entrambi i SNP sia nei casi che nei controlli. Tenendo conto del dimorfismo +49AG di CTLA4 una forte predominanza dell' allele A è stata evidenziata in entrambi i gruppi mentre l' allele G era presente con meno frequenza (35.4% nei pazienti AA e 36.8% in controlli). Le distribuzioni dei tre diversi genotipi sono risultate paragonabili tra i pazienti e i controlli anche quando i casi sono stati stratificati per la severità della malattia. Per il polimorfismo CT60 abbiamo osservato una piccola, ma non significativa, prevalenza dell' allele G nei casi di alopecia (55.4%) rispetto ai controlli (51.9%). Inoltre abbiamo trovato una minor frequenza del genotipo A/A e un aumentato numero di eterozigosi di A/G nei pazienti piuttosto che nei controlli (16.1% vs. 24.9% e 56.9% vs. 46.6%, rispettivamente). In un modello genetico in cui l' allele G dei SNP è il fattore di rischio della malattia, la prevalenza dell' eterozigosi di A/G e dell' omozigosi di G/G, considerate collettivamente, è risultata in modo significativamente più alto negli individui affetti che nei controlli (83.8% vs. 75.1%, $p=0.041$, OR=1.72, 95% CI 0.97-3.04). Inoltre l' analisi dei gruppi di alopecia secondo la severità della perdita dei capelli ha mostrato che il genotipo A/G+G/G era presente in modo più frequente nei pazienti con AA<50% che nei controlli (87.3% vs. 75.1%, $p=0.022$, OR=2.28, 95% CI 1.05-4.94) mentre una distribuzione simile del genotipo era

evidente tra i casi con AA>50% e i soggetti sani (Tabella 2). Inoltre la presenza della variante G sembra essere associata con l' alopecia areata soprattutto se vengono considerate le forme meno aggressive della malattia. Come atteso i pazienti affetti da alopecia erano DQ7-positivi(70.0% vs. 47.1% nei controlli sani, $p=3.55 \times 10^{-5}$; OR=2.62, 95% CI 1.64-4.20) confermando la predisposizione genetica dell' allele DQB1*03(DQ7) con lo sviluppo della malattia. Per studiare il modo in cui esiste un' associazione tra lo SNPs di CTLA4 e lo status HLA-DQ abbiamo analizzato nei casi di alopecia, considerati in modo separato per la severità della malattia, la frequenza genotipica dei polimorfismi biallelici di CTLA4 stratificati in base alla presenza o all' assenza dell' eterodimero ad alto rischio HLA-DQ7(Tabella 3).Non sono state rilevate differenze statisticamente significative nei confronti. Comunque, solo quando è stato considerato lo SNP CT60, una maggior presenza di genotipi A/G+G/G era evidente nei pazienti negativi a DQ7 con AA>50%, con un elevato valore della frequenza G/G (40.0% vs. 14.3%). La suddivisione dei gruppi di controllo sulle basi della tipizzazione HLA non ha mostrato alcuna differenza nella distribuzione del genotipo CTLA4 (dati non mostrati). Il linkage disequilibrium dell' analisi ha mostrato un D' value di 0.769 tra i due markers testati con quattro diversi aplotipi (Tabella 4) in cui la combinazione G (+49AG), A (CT60) era distribuita in modo differente tra casi e controlli (16% vs 53%, $p=0.014$, OR=0.28, 95% CI 0.09-0.82). In questo modo la co-espressione dell' allele G nel polimorfismo CTLA-4 +49AG e dell' allele A nel CTLA-4 CT60 si pensa che sia connesso con un minor rischio di sviluppare il fenotipo dell' alopecia. Non abbiamo trovato differenze statisticamente rilevanti tra la distribuzione dell' allele CTLA4/ genotipo/ aplotipo quando abbiamo comparato pazienti di sesso femminile e maschile (dati non mostrati). In

conclusione i nostri dati confermano la rilevanza del polimorfismo di CTLA4 CT60 ma escludono l'importanza della variante +49A/G nell'immunopatogenesi dell'alopecia areata in Italia.

Discussioni

Usando uno studio di tipo caso- controllo è stata, quindi, valutata l'associazione tra alopecia areata e gli SNPs +49AG e CT60 nel gene CTLA4. L'alopecia areata era significativamente più frequente nei pazienti portatori dell'allele G CT60 (A/G e G/G genotipo) che negli omozigoti A/A, considerando principalmente la forma lieve della malattia (AA<50%), mentre il genotipo A/A sembrava avere un effetto protettivo. Le nostre scoperte concordano con quelle ottenute nello studio di John, in cui un decremento significativo della variante CT60 A era presente nei casi piuttosto che nei controlli. Anche il fatto che l'associazione per il genotipo è specifica per il genotipo A/G+G/G è in accordo con l'effetto dominante dell'allele G. inoltre un aplotipo specifico per il gene CTLA4, portatore della variante CT60 A, risulta essere negativamente associato allo sviluppo di alopecia areata. Le analisi di stratificazione suggeriscono una possibile interazione sinergica di CTLA4 con l'allele HLA-DQB1*03(DQ7) nella suscettibilità per la comparsa di alopecia areata. Infatti c'era una tendenza evidente (non significativa dal punto di vista statistico anche se la dimensione del campione potrebbe essere insufficiente) a portare più frequentemente il genotipo G/G nei pazienti negativi per la molecola DQ7 che nel resto del gruppo. Queste ricerche suggeriscono che soprattutto in assenza di una forte predisposizione genetica (collegata agli eterodimeri HLA di tipo II), la via CTLA4 gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'alopecia areata. Per quanto

riguarda lo SNP +49AG, frequenze molto simili per entrambi gli alleli o i geni sono state osservate nei pazienti e nei controlli. Questi dati, comunque, non replicano l'associazione con la variante +49G riportate nella popolazione centro-Europea e l'eterogeneità tra le popolazioni europee, la penetranza genica come l'interazione con SNP potrebbe spiegare questo risultato. Non possiamo escludere la possibilità che altre varianti genetiche di CTLA4 presenti sono coinvolte nell'eziologia autoimmune della malattia. In conclusione la presenza dell'allele G CT60 contribuisce, anche se moderatamente, al rischio di alopecia areata, confermando l'importanza del CTLA4 come un locus di suscettibilità per l'autoimmunità. Dal momento che la molecola CTLA4 ha un ruolo critico nella determinazione della risposta immunitaria e della tolleranza è probabile che alcuni polimorfismi di CTLA4 potrebbero sottolineare le differenze nelle predisposizioni individuali alla malattia autoimmune, alterando la funzione delle proteine stesse. In modo interessante lo SNP CT60 è localizzato vicino la regione non tradotta 3' del gene CTLA4 e l'associazione di molte patologie con la variante G è stata spiegata come il risultato di una ridotta espressione del CTLA4 con una successiva riduzione della funzione inibitoria. Ulteriori studi dovrebbero essere indirizzati per valutare l'impatto dell'allele G CT60 sui possibili legami dei mRNA delle molecole regolatorie e il livello e la funzione della proteina tradotta CTLA4 per scoprire nuovi meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo dell'alopecia areata. Inoltre la ricerca per la predisposizione genetica in altre molecole costimolatorie e le vie immunologiche dovrebbero essere considerate per ricevere nuove conoscenze nella patogenesi dell'alopecia.

Tabella 2

SNP	AA patients						Controls (189)	
	All (130)		AA<50% (71)		AA>50% (59)			
	n	%	n	%	n	%	n	%
+49AG rs231775								
Allele								
A	168	(64.6%)	91	(64.1%)	77	(65.3%)	239	(63.2%)
G	92	(35.4%)	51	(35.9%)	41	(34.7%)	139	(36.8%)
Genotype								
A/A	52	(40.0%)	27	(38.0%)	25	(42.4%)	75	(39.7%)
A/G	64	(49.2%)	37	(52.1%)	27	(45.8%)	89	(47.1%)
G/G	14	(10.8%)	7	(9.9%)	7	(11.9%)	25	(13.2%)
CT60 rs3087243								
Allele								
A	116	(44.6%)	62	(43.7%)	54	(45.8%)	182	(48.1%)
G	144	(55.4%)	80	(56.3%)	64	(54.2%)	196	(51.9%)
Genotype								
A/A	21	(16.1%)	9	(12.7%)	12	(20.3%)	47	(24.9%)
A/G	74	(56.9%)	44	(62.0%)	30	(50.8%)	88	(46.6%)
G/G	35	(26.9%)	18	(25.3%)	17	(28.8%)	54	(28.6%)
Dominant model								
A/A	21	(16.2%)	9	(12.7%)	12	(20.3%)	47	(24.9%)
A/G + G/G	109	^a (83.8%)	62	^b (87.3%)	47	(79.7%)	142	(75.1%)

Tabella 3

		AA < 50% (n=71)		AA > 50% (n=59)		P-value
+49AG		n	%	n	%	
DQ7 pos	A/A	19	42.3%	17	37.8%	ns
	A/G	23	50.0%	23	51.1%	
	G/G	4	8.7%	5	11.1%	
DQ7 neg	A/A	8	32.0%	8	57.1%	ns
	A/G	14	56.0%	4	28.6%	
	G/G	3	12.0%	2	14.3%	
		AA < 50% (n=71)		AA > 50% (n=59)		P-value
CT60		n	%	n	%	
DQ7 pos	A/A	6	13.0%	9	20.0%	ns
	A/G	32	69.6%	21	46.7%	
	G/G	8	17.4%	15	33.3%	
DQ7 neg	A/A	3	12.0%	3	21.4%	ns
	A/G	12	48.0%	9	64.3%	
	G/G	10	40.0%	2	14.3%	

Tabella 4

Haplotypes (+49AG,CT60)	Patients (n=130)	Controls (n=189)	Chi2	p-value (Fisher)	OR (95% CI)
A,A	0.431	0.429	0.003	ns	-
A,G	0.215	0.204	0.125	ns	-
G,A	0.015	0.053	6.034	0.014	0.28 (0.09-0.82)
G,G	0.339	0.315	0.397	ns	-

Conclusioni

In base a quanto illustrato, l' alopecia areata è una condizione genetica causata dall' interazione con fattori ambientali come lo stress e le infezioni. Molti geni sono stati correlati con la predisposizione a sviluppare questa condizione clinica e comunque, se esaminati singolarmente, essi conferiscono un modesto rischio di sviluppare la patologia. È evidente che gli sforzi dei prossimi studi dovrebbero essere indirizzati ad ottenere una chiara definizione dell' ereditarietà genetica dell' alopecia areata per capirne meglio la patogenesi e per sviluppare nuovi test di laboratorio e trattamenti terapeutici. Attualmente, l' unico test molecolare disponibile nella pratica clinica per determinare la suscettibilità allo sviluppo della malattia potrebbe essere la tipizzazione dell' HLA- DQB1, dal momento che gli studi condotti mostrano come molti pazienti risultano positivi all' allele DQB1*03, che codifica per l' eterodimero DQ7.

Bisogna considerare, però, che molti soggetti, appartenenti alla popolazione sana, sono portatori di questo allele e quindi questo test potrebbe essere utilizzato per determinare la probabilità di sviluppare la malattia in tutti quegli individui che appartengono a gruppi a rischio come, ad esempio, i parenti in primo grado di pazienti affetti da alopecia areata.

Inoltre la stretta relazione tra DQB1*03(DQ7) e la severità della malattia sembra suggerire un'indicazione prognostica di questo test genetico in pazienti con alopecia.

Il crescente interesse suscitato dalla genetica, in relazione all' alopecia areata, sta mettendo in moto una serie di studi, volti ad individuare ulteriori alleli e loci di

suscettibilità ad essa correlati, al fine di comprendere, nel migliore dei modi, la patogenesi della malattia e, inoltre, trovare test ,di tipo molecolare, validi per effettuarne la diagnosi ed intraprendere un' opportuna terapia.

I loci da noi indagati sono quelli collegati ai geni codificanti per le molecole HLA di I e II tipo, Foxp3, ICOSL e CTLA4; tuttavia non riteniamo il nostro lavoro di ricerca concluso. La conoscenza delle tecniche genetiche a nostra disposizione, la coscienza della multifattorialità di questa malattia, la sua modalità di trasmissione di tipo non mendeliano e, quindi, l' ampia variabilità genetica esistente tra gli individui sono state e saranno le basi per lo studio di questa patologia per quanto riguarda la sua eziopatogenesi, la diagnosi della probabilità della sua comparsa e, in ultimo, la possibilità di individuare una terapia specifica mirata a mediare l' effetto delle componenti coinvolte nel suo sviluppo.

Le nostre ricerche mostrano come i fattori genetici siano correlati alla presenza di questa condizione clinica e alle sue manifestazioni, confermandone la validità a fini diagnostici e prognostici. Resta ancora da definire, però, il loro impiego nella pratica clinica e, perciò, un altro obiettivo dei nostri studi presenti e futuri corrisponde allo sviluppo di un test genetico in grado di combinare gli effetti individuali dei loci implicati nella suscettibilità della malattia ponendola in relazione con il rischio genetico globale. Questo test dovrà essere capace di discriminare accuratamente gli individui con un' alta probabilità di sviluppare alopecia areata e dare importanti informazioni sul suo sviluppo e sulla sua aggressività e perciò potrebbe aiutare il medico nella decisione del monitoraggio specifico della malattia per ogni paziente e, quindi, nella decisione della terapia.

11. ICONOGRAFIA



1. Chiazza alopecica



2. Alopecia areata in chiazze multiple



3. Ofiasi



4. Alopecia universale



3. Forma reticolare



5. Forma diffusa o incognita



6. Pitting ungueale



7. Trachionichia



8. a) onicomadesi



b) linee di beau



c) leuconichia puntata

12. BIBLIOGRAFIA

1. C Goh, M Finkel, PJ Christos, AA Sinha Profile of 513 patients with alopecia areata: associations of disease subtypes with atopy, autoimmune disease and positive family history; *JEADV* 2006;20, 1055–1060
2. Barahmani N, Schabath MB, Duvic M. History of atopy or autoimmunity increases risk of alopecia areata.; *J Am Acad Dermatol* 2009;61:581-591
3. Wang SJ, Shohat T, Vadheim C, Shellow W, Edwards J, Rotter JI; Increased risk for type I (insulin-dependent) diabetes in relatives of patients with alopecia areata (AA); *Am J Med Genet* 1994;51:234-9.
4. S.Y. Chu, Yi-Ju Chen, Wei-Cheng Tseng, Ming-Wei Lin, Tzeng-Ji Chen, Chian-Yaw Hwang, Chih-Chiang Chen, Ding-Dar Lee, Yun-Ting Chang Wen-Jen Wang and Han-Nan Liu; Comorbidity profiles among patients with alopecia areata: The importance of onset age, a nationwide population-based study. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:949-56
5. Price V. Alopecia areata: clinical aspects. *J Invest dermatol* 1991;96: 98s.
6. Gollnick, Orfanos CE. Alopecia areata: pathogenesis and clinical picture: In: Orfanos Ce, Happle R (eds). *Hair and hair diseases*. Berlin: Springer- Verlag 1990: 529-569.
7. Weitzner JM. Alopecia areata. *Am Fam Physician* 1990; 41(4): 1197-201.

8. John R Sullivan and Steven Kossard. Acquired scalp alopecia. Part I: A review. *Australas J Dermatol* 1998;39: 207-221.
9. John R Sullivan and Steven Kossard. Acquired scalp alopecia. Part I: A review. *Australas J Dermatol* 1999;40: 61-72.
10. Giorgio Re. Autoimmunità e alopecia. *Dermatologia e cosmesi* 2007. La pelle.
11. Paus R. Principle of hair cycle control. *The Journal of Dermatology* 1998; vol 25:793-802.
12. Recupero SM, Abdolrahimzadeh S, De Dominicis m, Mollo R, Carboni I, Rota L, Calvieri S. Ocular alterations in alopecia areata. *Eye* 1999 Oct;13 (Pt): 643-6.
13. F. Rantuccio, M. Mastrolonardo e A. Conte: Area Celsi. Osservazioni personali e revisione della letteratura. *G. Ital Dermatol Venereol* 1995; 130:23-35.
14. Robert B. Skinner, Jr MD William H. Light, MD, George F. Bale, MD, E. William Rosemberg, MD. Alopecia Areata and presence of cytomegalovirus DNA. *JAMA*, MAY 10, 1995-Vol 273, No 18.
15. Boni R., Burg G., Wirth Hp. H. Piloni and Skin disease – a (still) intact myth? *Schweiz Med Wochenschr* 2000 Sep.16; 130 (37): 1305-8.
16. Vafan J. Weinberg Jn, Smith B., Mizuguchi RS. Alopecia in association with sexually transmitted disease: a review. *Cutis* 2005 Dec; 76 (6): 361-6.
17. S. Sedani e P. Danese. Atopia e alopecia Areata. *G. Ital Dermatol Venereol* 1991;126:535-8.

18. K. Katagiri, Shoko Ara kawa and Yutaka Datano. In vivo levels of IL-4, IL-10, TGFβ1 and INFγ mRNA of the peripheral blood mononuclear cells in patients with alopecia areata in comparison to Those in patients with atopic dermatitis. Springer- Verlag 2006.
19. De Andrade M, Jackow Cm,Dahm n, Hordinsky m et al. Alopecia areata in families : association with HLA locus. J Investig Dermatol Symp Proc.1999 Dec;4 (3):220-3.
20. D. Martin Carter, MD, Phd, Brian V., Jegasothy, MD. Alopecia areata and Down Syndrome. Arch Dermatol 1976; Vol 112:1397-1399.
21. Madhulika A. Gupta, Aditya K. Gupta and Gena N. Wateel. Stress and Alopecia areata: a psychodermatologic Study. Acta Derm Venereol 1997;77:296-298.
22. G.C.Soavi, F. De camierada, A. Santori. Approccio psicoterapeutico nell'alopecia areata. Chron.derma.anno XVIII –N 3/87.
23. Teraki Y, Imanishi K, Shiodara T. Cytokines in alopecia areata: contrasting cytokine profiles in localized form and estensive form (alopecia universalis). Acta derm.Venereol 1996 Nov; 76/6:421-3.
24. M. Shohat, D. Mimoussi, D-Ben-Amitari, B. Sreduri, D. Sredm, B. Shohat and M. David. In vitro cytokine profile in childhood areat and immunomodulatory affects of AS-101. Clinical and Experimental dermatology, 30,432-434.
25. Y.Kumano, M.Fujimoto , R.Watanabe, N. Ishiura, H. Nakashima et al. Serum chemokine profiles in patients with alopecia areata. Clinical and laboratori investigation. DO/10.1111/J.1365-2133.2007 07943.

26. Friedmann P.S. Alopecia areata and autoimmunity. *Br J Dermatol* 1981;105:153-7.
27. Jautova J, Jarcuskova D, Ficova M, Dubivska M. Alopecia Areata an autoimmune disorder? *Bratisl Lek Listy* 1995;96 (3):144-7.
28. Siripen Puavilai, M.D., Gobehari Puavilai, M.D. Prevalence of Thiroid disease in patients wiyh alopecia areata. *International Journal of Dermatology*. Vol 33, NO.9. September 1994.
29. A. Tommasini, T. Not, R. Marzani, A. Ventura. Malattia celiaca: tra passato e futuro. *Gastroenterologia* 1999;29:181-196.
30. Vinod K. Sharma, M.D., Bhushan Kumar, M.D., MNAMS, and Goutam Dawn, M.D., D.N.B. A clinical study of childhood alopecia areata in Chandigarh, India. *Pediatric dermatology* Vol13 No 5 372-377,1996.
31. T.C. Aw and J.S. Cheah. Diabetes Mellitus presenting with Alopecia areata Totalis. *The Lancet* 1978;29:268.
32. W. J. Cunliffe, R. Hall, D. J. Newell and C. J. Stevenson. Vitiligo, Thyroid disease and autoimmunity. *Br. J. Derm.* 1968;80:135-139.
33. B.K. Goh, N.A.C. Van Geel, K.Ongenal, J.M. Neeyaert. Vitiligo: new hipotesis, new data. *G Ital dermatol venereol* 2005; 140:615-7.
34. Ashraf Montazeri, Guy Serre, Jean Kanitakis. Alopecia areata. *Eur J Dermatol* 1996;6:471-8.
35. Madani S. And Shapiro J, MD, FRCPC. Alopecia areata. *J Am Acad Dermatol*, Vancouver, April,2000.
36. Hiromi Tsuboi, Ryoji Tanei Fujimura, Yukinori Ohta and Kensei Katsuoka. Characterization of infiltrating T cells in human Scalp explants from alopecia

areata to SCID Nude Mice: possible Role of the disappearance of CD8+ T Lymphocytes in the process of hair regrowth. *The J Dermatol* 1999;Vol 26:797-802.

37. Paus R. Immunology of the hair follicle. Presented at THIRD international Research Workshop on alopecia areata. Washington 1998,DC, Nov 5.
38. Christoph T., Muller-Rover S., Audring H., Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, Ruckert R, Paus R. The Human Hair Follicle Immune System: Cellular Composition and Immun Br J Dermatol 2000 May;142(5):82-73.
39. Desmond J. Tobin, G.I. Biol., David A. Fenton, M.R.C.P.; and Marion D. Kendall, Ph. D. Cell Degeneration in Alopecia. Areata An ultrastructural study. *Am J Derm* 1991;13(3):248-256.
40. Desmond J. Tobin, Norman Orentreich, David A Fenton, and Jean-Claude Bystryn. Antibodies to Hair Follicles in Alopecia Areata. *J Investigat Dermatol* 1994;102:721-724.
41. Morhenn VB. Cell-mediated autoimmune diseases of the skin: some hypothesis. *Medical Hypothesis* 1997;49:241-245.
42. David A. Whiting, MD; FRCP (edin). Histopathologic Feature of Alopecia Areata. *Arch Dermatol* 2003;139:1555-1559
43. Majewski BBJ, Koh MS; Taylor DR, et al. Increased ratio of helper-to-suppressor T-cells in alopecia areata. *Br J Dermatol* 1984;110:171-5.
44. R. B. Skinner, Jr., W. H. Light, Craig Leonardi, G. F. Bale, and E. W. Rosenberg. A molecular approach to Alopecia Areata. *J Investigat Dermatol* 1995,Vol 104,No 5,supplement.

45. D. M., Hoss a. nd Jane M. Grant-Kels. Diagnosis: Alopecia areata or not? Seminars in cutaneous Medicine and Surgery 1999; Vol 18;No1(March):84-90.
46. Rossi A, Daniele L, Bonaccorsi P, Giustini S, Calvieri s: Microanalysis:application in hair study. DJJ Van Neste and VA Randall. Hair research for the next millenium, Elseiver Science BV, Bruxelles,1996.
47. Rossi A, Daniele L, Bonaccorsi P, Carlesimo M, Calvieri S. Microanalysis: study of hair affected by trichothiodystrophy. DJJ Van Neste and VA Randall. Hair research for the next millenium, Elseiver Science BV, Bruxelles, 1996.
48. S. Romagnani, L. Emmi, F. Almerigogna. Malattie del sistema immunitario. Mc graw Hill.
49. K.C. Meyer, J.E. Klatte, H.V. Dinh, M.J. Harries, K. Reithmayer, W. Meyer, R. Sinclair and R. Paus. Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles British Journal of Dermatology 2008 159, pp1077–1085
50. R. Paus, B. J. Nickoloff and T. Ito. A ‘hairy’ privilege TRENDS in Immunology Vol.26 No.1 January 2005
51. Sanghoon Lee, Long-Quan Pi, Young-Lip Park, Kyu-Uang Whang, Soo-Young Jeon, Won-Soo Lee, Letter to the Editor, Journal of Dermatological Science 55 (2009) 193–204
52. Ito T, Ito N, Bettermann A, Tokura Y, Takigawa M, Paus R. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting thehuman hair follicle as a model. Am J Pathol 2004;164:623–34.

53. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 2000;80:979–1020.
54. Sacerdote P, Gaspani L, Panerai AE. Role of beta-endorphin in the modulation of immune responses: perspectives in autoimmune diseases. *Adv Exp Med Biol* 2001;493:137–42
55. Kim HS, Cho DH, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, Park HJ. Immunoreactivity of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and alpha melanocyte-stimulating hormone in alopecia areata. *Exp Dermatol* 2006;15: 515–22.
56. Ito T. Hair follicle is a target of stress hormone and autoimmune reactions. *J Dermatol Sci*. 2010 Nov;60(2):67-73. Epub 2010 Sep 29
57. Alzolibani E, S. Zari, A. A. Ahmed Epidemiologic and genetic characteristics of alopecia areata (part 2) *Acta Dermatovenerol APA* | 2012;21:15-19
58. Ito T, Ito N, Saathoff M, Bettermann A, Takigawa M, Paus R. Interferon-gamma is a potent inducer of catagen-like changes in cultured human anagen hair follicles. *Br J Dermatol*. 2005 Apr;152(4):623-31.
59. Arany I, Tying SK, Brysk H, Brysk MM. Induction by interferon gamma of its receptor varies with epithelial differentiation and cell type. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:331–4.
60. Kinori M, Bertolini M, Funk W, Samuelov L, Meyer VC, Emelianov S, Hasse R, Paus R. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) may award relative

protection from interferon- γ -induced collapse of human hair follicle immune privilege *Experimental Dermatology*, 2012, 21, 221–235

61. Eduardo E. Benarroch CGRP : Sensory neuropeptide with multiple neurologic implications *Neurology* 2011;77;281
62. Ito T, Ito N, Saatoff M, Hashizume H, Fukamizu H, Nickoloff BJ, Takigawa M, Paus R. Maintenance of hair follicle immune privilege is linked to prevention of NK cell attack. *J Invest Dermatol.* 2008 May;128(5):1196-206.
63. Ito T. Hair follicle is a target of stress hormone and autoimmune reactions. *J Dermatol Sci.* 2010 Nov;60(2):67-73.
64. Arlene H. Sharpe Mechanisms of costimulation *Immunological Reviews* 2009 Vol. 229: 5–11
65. J.B.Wing, S.Sakaguchi Multiple T reg suppressive modules and their adaptability *Frontiers in immunology* June 2012 | Volume 3 | Article 178 |
66. Wing K, et al. CTLA-4 control over Foxp3+regulatory T cell function. *Science* 2008;322:271–275.
67. S. Sakaguchi and K. Wing Dampening by Depletion *IMMUNOLOGY SCIENCE* VOL 332 542 (2011);
68. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600 (2011)
69. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T. Spatiotemporal basis of

- CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):326-39
70. Grohmann,U.,Orabona,C.,Fallarino,F.,Vacca,C.,Calcinaro,F.,Falorni,A.,Candeloro,P.,Belladonna,M.L.,Bianchi,R.,Fioretti,M.C.,andPuccetti,P.(2002).CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 1097–1101
71. Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, Kroczek RA Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med*. 2003 Jan 20;197(2):181-93.
72. Sakaguchi,S.,Wing,K.,and Miyara, M. (2007).Regulatory T cells—a brief history and perspective. *Eur.J. Immunol.* 37, S116–S123
73. Dejean,A.S.,Beisner,D.R.,Ch’én,I.L.,Kerdiles,Y.M.,Babour,A.,Arden,K.C.,Castrillon,D.H.,Depinho,R.A.and Hedrick,S.M.(2009).Transcription factor Foxp3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat.Immunol.* 10, 504–513
74. Beier UH, Wang L, Bhatti TR, Liu Y, Han R, Ge G, Hancock WW Sirtuin-1 targeting promotes Foxp3+ T-regulatory cell function and prolongs allograft survival. *Mol Cell Biol*. 2011 Mar;31(5):1022-9.
75. Rochman, I., Paul, W.E. & Ben-Sasson, S.Z. IL-6 increases primed cell expansion and survival. *J. Immunol.* 174, 4761–4767 (2005).
76. Teft, W.A. et al. (2006) A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 65–97
77. Amos Gilhar. Collapse of Immune Privilege in Alopecia Areata: Coincidental or Substantial? *Journal of Investigative Dermatology* (2010) 130, 2535–2537.

78. Amos Gilhar, Amos Etzioni and Ralf Paus, Alopecia Areata N Engl J Med 2012;366:1515-25.
79. F. Megiorni, A. Pizzuti, B. Mora, A. Rizzuti, V. Garelli, C. Maxia, M. Carlesimo, M.C. Fotruna, R. Delle Chiaie, G. Cavaggioni and A. Rossi Genetic association of HLA-DQB1 and HLA-DRB1 polymorphisms with alopecia areata in the Italian population ,BJD 2011 British Association of Dermatologists 2011 165, pp823–827
80. Martinez-Mir A, Zlotogorski A, Gordon D, et al. Genome wide scan for linkage reveals evidence of several susceptibility loci for alopecia areata. Am J Hum Genet 2007;80:316-28.
81. .Petukhova L, Duvic M, Hordinsky M, Norris D, Price V, Shimomura Y, Kim H, Singh P, Lee A, Chen WV, Meyer KC, Paus R, Jahoda CA, Amos CI, Gregersen PK, Christiano AM Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. Nature. 2010 Jul 1;466(7302):113-7
82. Gilhar A, Etzioni A, Paus R. Supplement to Alopecia areata. N Engl J Med 2012;366:1515-25
83. G. Fabbrocini, L. Panariello, V. De Vita, C. Vincenzi, C. Lauro, D. Nappo, F. Ayala, A. Tosti Quality of life in alopecia areata: a disease-specific questionnaire Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2012.
84. Amerio, Berengo, Calvieri, Chimenti, Pippione: Dermatologia e Venereologia, II ed 2009., edizioni Minerva Medica.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare, con profonda stima e riconoscenza, il professor Alfredo Rossi perché, con passione e pazienza, mi ha mostrato la bellezza di un argomento così particolare e specialistico senza farmi mai dimenticare i suoi profondi legami con le Scienze di base e la Medicina Interna . È con profonda riconoscenza ed ammirazione che gli sono grata per aver messo a mia disposizione, con onestà e piacere, il suo sapere, le sue conoscenze cliniche, il suo lavoro e il suo tempo.

Ringrazio con affetto la dottoressa Daniela Bianchini perché, con la sua affabilità e le sue premure, mi ha mostrato come interagire, durante la mia frequenza presso l' Ambulatorio Generale, con i pazienti e le loro patologie. I suoi sorrisi, la sua allegria e la sua amorevolezza mi hanno insegnato il rapporto medico paziente e la bellezza della Dermatologia. Le sono, infine, profondamente riconoscente per avermi accolta da subito con simpatia e per aver avuto, sempre, fiducia in me.

È con amore che ringrazio i miei genitori per avermi dato la vita e la possibilità di crescere serenamente. Questo giorno è per mia madre che mi ha aiutato ad essere ciò che sono e che mi è stata d' esempio in ciò che voglio essere e diventare; è per mio padre perché mi ha insegnato a sorridere, sempre; è per mia sorella e il legame indissolubile che ci unisce.

È per Andrea, che oggi c'è. Grazie all' amore che mi dona ogni giorno della nostra vita insieme.

Ringrazio tutta la mia famiglia, grande ed affettuosa. Ringrazio Nonno Luigi per i suoi bellissimi occhi celesti pieni di commozione, Nonna Pasqualina per la sua amorevolezza nel prendersi cura di noi, Nonna Milena per le sue preghiere e Nonno Rodolfo che mi ha guardato da lassù; tutti i miei cugini e i miei zii, in special modo Zia Anna e Zio Gaetano perchè non mi è mai mancato il loro appoggio e il loro

affetto e zio Mario perché è a casa sua che, da piccola, lessi il giuramento d' Ippocrate e allora decisi.

Ringrazio Anna, molto più che un' amica, perché ho avuto la fortuna di incontrarla e perché ha condiviso con me gli ultimi anni senza farmi mai mancare la sua amicizia incondizionata, i suoi consigli, i suoi rimproveri, la sua comicità, la "telepatia", la sua determinazione e la sua passione per la vita e per quanto stavamo studiando. È stato prezioso tutto il tempo passato insieme e, mentre non ce ne accorgevamo, siamo cresciute.

Ringrazio gli amici che mi sono stati sempre vicini e che non mi hanno fatto mai mancare la loro presenza.

I miei compagni di studi all' università senza i quali le ore sui libri sarebbero passate molto più lentamente: Alessandro per la sua amicizia tenera, Arianna per la precisione e la passione che ha sin dal primo giorno, Marcello per la pazienza, Gianmarco per i ponderati consigli e tutta la "crew" dell' aula studio di Malattie Infettive perché lì con loro ho riso, ho studiato e ripetuto, mi sono commossa, ho imparato ad ascoltare, a confrontare le nostre conoscenze e a condividere con tutti loro l' esperienza di crescita umana e professionale più bella che potessi aspettarmi.

Silvia e Sara, coinquiline perfette, per la loro disponibilità, la loro comprensione e le loro cure.

Giovanni, Silvia e Chiara perché , nonostante il tempo, niente è cambiato.

Ringrazio la grande famiglia ANTAS perché mi ha insegnato ad avere fiducia nella forza del sorriso e mi ha mostrato quanto sia bello donarlo a chi ne ha bisogno.

Ringrazio, infine, tutti i docenti e le persone che, fino ad oggi, hanno avuto qualcosa da insegnarmi riuscendo a rendermi una persona migliore.

Ringrazio, in ultimo, me stessa perché sono finalmente riuscita in ciò che desideravo essere: una buona persona. Resta da realizzare solo l' ultimo desiderio, ciò per cui ho studiato e non smetterò mai di auspicare: essere un buon medico.

