

IMMUNITÀ ED ATEROSCLEROSI: ASPETTI EMERGENTI

GIUSEPPE DANILO NORATA^{1,2}, ENRICO AMMIRATI^{3,4}, LUCIA CUTULI,
ALBERICO LUIGI CATAPANO^{1,2,5}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano;

²Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo;

³Centro di Biologia Cardiovascolare, Università Vita e Salute San Raffaele, Milano;

⁴Heart Care Foundation, Firenze;

⁵IRCCS, Multimedica, Milano

SOMMARIO

L'aterosclerosi è una malattia immuno-mediata, predisposta da alcuni fattori di rischio. La precisa patogenesi non è ancora del tutto chiara, ma è stato messo in evidenza come la progressione e l'instabilità delle lesioni aterosclerotiche siano promosse da una serie di risposte cellulari e molecolari altamente specifiche ed assimilabili ad una malattia infiammatoria. La risposta immunitaria sia innata che adattativa gioca un ruolo importante nello sviluppo e progressione dell'aterosclerosi. Elevati livelli di lipoproteine a bassa densità (LDL) e di trigliceridi, ridotti livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL) insieme al diabete mellito, il fumo di tabacco e l'ipertensione arteriosa, costituiscono i principali fattori di rischio per l'aterosclerosi; tuttavia, le ipotesi più recenti, suggeriscono anche il ruolo potenziale di una componente autoimmune, probabilmente iniziata e mantenuta da lipoproteine modificate e/o da antigeni di origine microbica, nel promuovere la patologia. Scopo di questa rassegna è presentare alcuni aspetti emergenti nella relazione aterosclerosi e risposta immunitaria. Particolare rilievo sarà dato al ruolo dei pathogen recognition receptors (PRRs) e delle pathogen recognition molecules (PRMs) in grado di connettere la risposta immunitaria innata ed adattativa. Verranno inoltre trattati i differenti subset monocitari e linfocitari circolanti e la possibilità di modulare la chemiotassi nelle lesioni aterosclerotiche.

La comprensione del ruolo emergente delle componenti immunitarie innata, adattativa ed autoimmunitaria nel contesto del modello pato-fisiologico dell'aterosclerosi è di fondamentale importanza per identificare sia nuovi potenziali bersagli terapeutici sia marcatori di progressione di malattia in grado di migliorare la stratificazione dei pazienti in aggiunta ai normali fattori di rischio.

Parole chiave: pentraxine, polarizzazione macrofagica, linfociti T regolatori.

Introduzione

L'aterosclerosi è una malattia immuno-mediata, predisposta da numerosi fattori di rischio. La precisa patogenesi non è ancora del tutto chiara, ma è stato messo in evidenza come la progressione e l'instabilità

delle lesioni aterosclerotiche siano promosse da una serie di risposte cellulari e molecolari altamente specifiche ed assimilabili ad una malattia infiammatoria (1-3). Elevati livelli di lipoproteine a bassa densità (LDL) e di trigliceridi, ridotti livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL) insieme al diabete mellito, il fumo di tabacco e l'ipertensione arteriosa, costituiscono i principali fattori di rischio per l'aterosclerosi, tuttavia le ipotesi più recenti suggeriscono anche il ruolo potenziale di una

Indirizzo per la corrispondenza

Giuseppe Danilo Norata

Dipartimento di Scienze Farmacologiche,

Università degli Studi di Milano

e mail: danilo.norata@unimi.it

componente autoimmune, probabilmente iniziata e mantenuta da lipoproteine modificate (4) e/o da antigeni di origine microbica (5) nel promuovere la patologia. Uno dei principali processi aterogeni è legato all'accumulo di LDL a livello dello spazio sub-endoteliale. I fattori di rischio e lo shear stress, che agisce sulle pareti dei vasi a livello delle biforcazioni, possono condurre ad una attivazione e disfunzione endoteliale. Tali alterazioni favoriscono l'accumulo di LDL nelle pareti dei vasi. Le LDL accumulate possono poi andare incontro a modificazioni ossidative trasformandosi in particelle pro-infiammatorie (oxLDL) che a loro volta contribuiscono a peggiorare lo stato di disfunzione endoteliale, portando all'espressione di VCAM-1 (molecola di adesione cellulo-vascolare-1) e ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare-1), e al rilascio di chemochine, necessarie al reclutamento di monociti e cellule T a livello dell'intima (6).

Il progredire del processo infiammatorio porta ad un aumento e attivazione dei monociti-macrofagi e linfociti T, i quali secernevano citochine chemochine e fattori di crescita che conducono ad una progressione della placca ed eventuale formazione di necrosi locale e iperplasia delle cellule muscolari lisce. I monociti infiltrati a livello sub endoteliale sotto l'influenza di alcuni stimoli locali, si differenziano in macrofagi e aumentando l'espressione dei recettori scavenger (SRs) e dei recettori coinvolti nella risposta immunitaria innata, i toll-like receptors (TLRs). SRs mediano la captazione da parte dei macrofagi delle particelle di oxLDL, provocando la formazione di perossidi lipidici, l'accumulo intracellulare degli esteri di colesterolo e successiva formazione di cellule schiumose (macrofagi carichi in lipidi) a livello dell'intima vascolare (6). Pertanto le oxLDL agiscono come fattori pro-infiammatori sia nella fase inizia-

le, contribuendo all'attivazione endoteliale, e promuovendo la formazione della placca aterosclerotica, sia durante la progressione della malattia amplificando la risposta infiammatoria favorendo l'attivazione della risposta macrofagica e quindi l'interazione macrofagi-linfociti T. Le prime evidenze di un coinvolgimento della risposta adattativa nell'aterosclerosi, risalgono alla metà degli anni '80 quando Jonasson e Hansson hanno descritto la presenza nelle placche carotidiche umane di linfociti T con un profilo di attivazione espresso dalle molecole HLA-DR e VLA-1 (7).

Hansson e Stemme nella seconda metà degli anni '90 hanno poi evidenziato come tali linfociti T presenti nelle placche riconoscessero delle strutture ossidate delle lipoproteine (4). Queste pubblicazioni e numerose altre, hanno condotto a focalizzare l'interesse sui macrofagi e sulle cellule T come mediatori della progressione dell'aterosclerosi e determinanti della suscettibilità della placca alla rottura (8).

Altra componente della placca è costituita dalle cellule muscolari lisce, che giocano un ruolo in una seconda fase durante il processo di formazione della placca, guidate dalla risposta infiammatoria verso la proliferazione o l'apoptosi.

La risposta immune innata e quella adattativa, mediata dai linfociti T e B, sarebbero poi responsabili del mantenimento di uno stato infiammatorio locale in presenza di un antigene a livello della placca. In una fase successiva di maturazione dell'ateroma il processo infiammatorio mediato dall'interazione delle cellule T con i macrofagi e le cellule B potrebbe auto-mantenersi anche in assenza dell'antigene che ha iniziato il processo. Accanto ai concetti classici legati al ruolo delle ox-LDL, dei macrofagi e dei linfociti CD4+ nell'aterosclerosi, gli studi più recenti hanno evidenziato, sia la presenza di numerosi altri pla-

per immunitari come cellule dendritiche, neutrofilii, linfociti T regolatori (Treg), ma anche suggerito regolazioni fini della risposta immunitaria legata alle differenti sottopopolazioni monocitarie e linfocitarie circolanti, alle complesse interazioni PRRs (pathogen recognition receptors) e PRMs (pathogen recognition molecules) in grado di connettere la risposta immunitaria innata ed adattativa durante l'aterosclerosi. Scopo di questa review è approfondire alcuni di questi aspetti emergenti nella patologia aterosclerotica.

Immunità innata

Il sistema immunitario innato consiste di due componenti, una umorale ed una cellulare. Recentemente entrambe queste componenti sono state oggetto di approfondimenti nel campo dell'aterosclerosi.

Pentraxine

Le pentraxine, (per esempio quelle corte come proteina C reattiva oppure quelle lunghe come PTX3) sono fattori chiave della risposta immune umorale insieme alla cascata del complemento, le collectine e le ficoline. In risposta ad un danno tissutale oppure alla presenza di microrganismi, i neutrofilii, i macrofagi e le cellule dendritiche sono le principali sorgenti di queste molecole definite PRMs. Queste a loro volta interagiscono con e regolano diversi effettori cellulari attraverso la attivazione e modulazione della cascata del complemento; l'agglutinazione e neutralizzazione; l'opsonizzazione e la modulazione dell'infiammazione. Per questo motivo la componente umorale dell'immunità innata rappresenta un sistema integrato composto da diverse molecole che mostra alcune caratteristiche funzionali comuni con gli anticorpi.

Tra i numerosi PRMs sicuramente le

pentraxine giocano un ruolo chiave (9). Si tratta di una superfamiglia di proteine di fase acuta, altamente conservate durante l'evoluzione che può essere classificata in pentraxine corte come la proteina C reattiva (CRP) e lunghe come PTX3. Quest'ultima possiede un lungo dominio N-terminale accoppiato al tipico dominio C-terminale pentraxinico e si differenzia da CRP in termini di organizzazione genica, sorgente cellulare (fegato per CRP, macrofagi, cellule dendritiche, neutrofilii ed endotelio per PTX3) e ligandi riconosciuti. Nell'uomo PTX3 come CRP è un marker di aterosclerosi e correla con il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari (9). A differenza di CRP dove la sequenza e la regolazione non è conservata tra topo e uomo (nel topo CRP non è una proteina di fase acuta) per PTX3 durante l'evoluzione si è osservata un'elevata conservazione in termini di sequenza, organizzazione genica e regolazione permettendo l'utilizzo di modelli animali transgenici per chiarire il suo ruolo fisiopatologico. In un modello di infarto miocardico, la mancanza di PTX3 si associa ad un aumento del danno cardiaco e della risposta infiammatoria (10).

Più recentemente abbiamo dimostrato che PTX3 può essere modulata dalle HDL nelle cellule endoteliali (11) e soprattutto la carenza di PTX3 in un topo privo di apolipoproteina E (ApoE knock out) si associa con un aumento dell'aterosclerosi, dell'accumulo di macrofagi nella placca ed un aumento del profilo infiammatorio vascolare (12). Queste osservazioni, indicano un ruolo protettivo per PTX3 a livello cardiovascolare, suggerendo la possibilità che i livelli aumentati di PTX3 in soggetti con malattie cardiovascolari possano rappresentare una risposta fisiologica protettiva che correla con la severità della malattia (*Figura 1*). I dati che si stanno accumulando suggeriscono pertanto che l'aumento

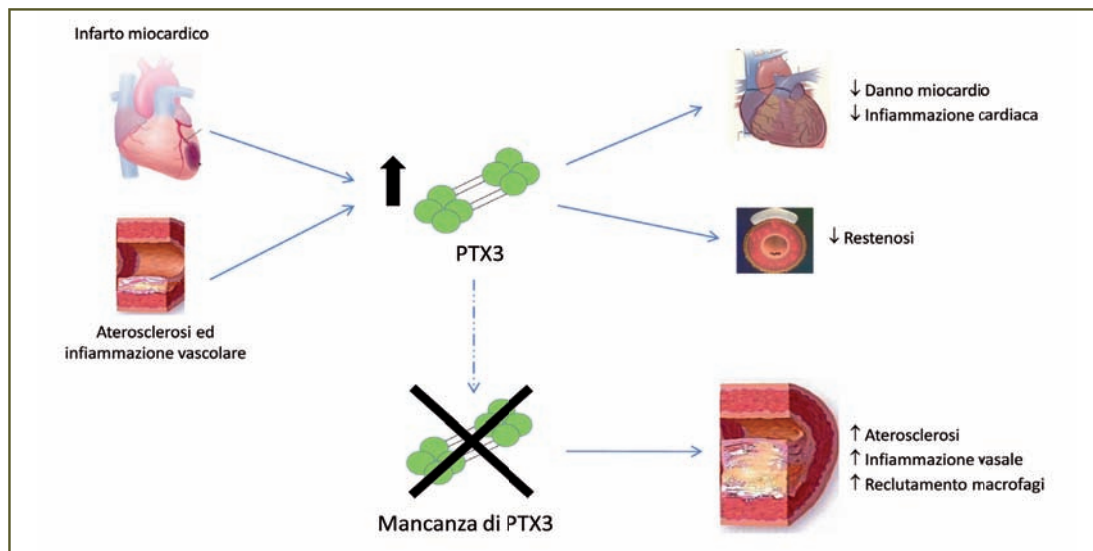


Figura 1 - PTX3 ed malattie cardiovascolari.

PTX3 viene indotta rapidamente a livello tissutale e rilasciata in circolo nei siti di infarto miocardico, aterosclerosi e danno vascolare. Un serie di studi in modelli sperimentali ha mostrato che:

- le aree infartuate sono significativamente maggiori nei topi carenti di PTX3 rispetto agli animali wild type, e l'utilizzo di PTX3 ricombinante riduce il danno e l'infiammazione cardiaca;
- la sovraespressione di PTX3 blocca la restenosi nel modello di danno alla carotide del ratto;
- la mancanza di PTX3 è associata con aumentata aterosclerosi, aumento dell'accumulo di macrofagi ed infiammazione nelle lesioni aterosclerotiche.

di pentraxine durante l'aterosclerosi possa non rappresentare una risposta dannosa ma piuttosto un ulteriore tentativo di protezione da parte del nostro organismo.

Pattern-recognition receptors

I pattern-recognition receptors (PRRs) sono una superfamiglia di recettori coinvolti nel riconoscimento ed eliminazione del materiale ritenuto dannoso.

Questa famiglia consiste di recettori solubili, di membrane e citoplasmatici. Sono stati descritte due classi principali di PRRs, i recettori endocitici che mediano principalmente l'uptake dell'antigene e i recettori-segnale necessari per l'attivazione della risposta infiammatoria. I primi mediano la clearance delle lipoproteine, dei frammenti apoptotici e l'eliminazione dei patogeni oltre all'uptake dell'antigene necessario per la successiva presentazione da parte delle cellule presentanti l'anti-

gene (APCs). In questo gruppo sono comprese diverse classi di recettori tra cui gli scavenger receptors (SRs), le C-lectine e i recettori che mediano l'opsonizzazione. Il legame a questi recettori normalmente non si traduce nella produzione di citochine pro-infiammatorie. Nell'aterogenesi questi recettori sono coinvolti nella clearance delle ox-LDL e quindi partecipano alla formazione delle cellule schiumose.

La seconda grande classe di recettori è costituita dai PRRs, la cui attivazione è associata alla modulazione di un segnale intracellulare. Esiste spesso un crosstalk tra i diversi PRRs che si traduce nell'attivazione di meccanismi comuni che determinano il tipo di risposta immunitaria atta all'eliminazione del patogeno o alla modulazione della risposta infiammatoria conseguente al danno tissutale. La principale classe di PRRs è costituita dai toll-like receptors (TLRs) che partecipano all'immunità innata con

riflessi anche su quella adattativa. Ad oggi sono stati caratterizzati 10 TLRs nell'uomo e 13 nel topo; l'attivazione di questi recettori si traduce in una risposta infiammatoria acuta associata all'induzione di chemochine, citochine e molecole co-stimolatorie. I TLRs hanno quindi un ruolo essenziale anche nel controllare e promuovere la risposta adattativa verso un determinato antigene. In particolare, l'attivazione di questi recettori induce l'espressione delle molecole di adesione ed il rilascio di fattori chemiotattici che attirano cellule immunitarie nei siti infiammati. I TLRs sono espressi in tutti i tessuti e principalmente dalle cellule del sistema immunitario innato, compresi i macrofagi, cellule dendritiche e mastociti ma anche cellule endoteliali e muscolari lisce. I TLRs contribuiscono all'aterosclerosi promuovendo la presentazione dell'antigene che a sua volta risulta nell'attivazione e polarizzazione dell'immunità adattativa. Inoltre i segnali intracellulari attivati attraverso il TLRs sono in grado anche di modulare il metabolismo lipidico e influenzare la formazione delle cellule schiumose. Tra i recettori più rilevanti, quello più espresso è il recettore TLR4 (6). TLR4 è presente su diversi tipi di cellule (cellule endoteliali, macrofagi, cellule dendritiche) ma viene principalmente espresso e attivato sui macrofagi ricchi di lipidi (cellule schiumose). L'espressione e l'attività dei recettori TLR4 aumenta in risposta alle oxLDL attivando i macrofagi e inducendo la stimolazione di fattori pro-infiammatori quali IL18 e IL12. Le interleuchine promuovono e modulano l'attivazione delle cellule T che contribuiscono alla progressione dei processi infiammatori a livello della lesione aterosclerotica. Le oxLDL esercitano anche un'azione chemotattica nei confronti dei monociti. Infatti i recettori TLR4 sovraattivati possono indurre la proteina chemotattica dei monociti-1 (MCP-1) e altre

chemochine coinvolte nel reclutamento dei monociti (13). Mentre numerosi dati in modelli murini ed in vitro evidenziano un importante ruolo di TLR4 nell'aterosclerosi, i dati nell'uomo sono più confusi. Un polimorfismo comune di TLR4 associato ad ipofunzionalità del recettore è stato inizialmente associato ad una riduzione degli infarti miocardici (14).

Tuttavia studi più recenti non sono stati in grado di validare questi risultati (15) ed anche l'associazione con l'intima media thickness non è stata confermata (16, 17). Quindi data la possibilità di sviluppare approcci terapeutici contro questi target è ancora importante comprendere a fondo il ruolo dei TLRs nell'uomo e soprattutto l'interazione con gli altri PRRs così come con i pathway metabolici.

Subsets monocitari circolanti

L'attivazione della risposta immunitaria innata è fondamentale per l'induzione della risposta infiammatoria a livello della parete vasale. La presenza delle cellule infiammatorie nella placca aterosclerotica dipende dalle modalità del loro reclutamento e/o eventuale egressione oltre che al bilancio tra proliferazione, sopravvivenza e apoptosi.

L'attivazione della risposta immunitaria innata si basa sul reclutamento di cellule circolanti di origine principalmente monocitaria durante l'aterogenesi (1). Le popolazioni monocitarie, tuttavia, possono essere caratterizzate sulla base della presenza di tre antigeni: Ly6C CCR2 e CX3CR1. Monociti Ly6C^{high}CCR2⁺CX3CR1^{low} sono stati descritti come infiammatori in grado di migrare facilmente nelle arterie prone all'aterosclerosi e differenziarsi a macrofagi (18). Monociti Ly6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{high} invece sono residenti in circolo, controllano i vasi sanguigni e sono in grado di extravasare durante alcuni tipi di infezione trasfor-

mandosi in macrofagi M2 (19). Monociti Ly6C^{high} utilizzano CCR2, CX3CR1 e CCR5 per migrare nelle aorte mentre monociti Ly6C^{low} utilizzano quasi esclusivamente CCR5. Nonostante la maggior parte delle evidenze siano state ottenute in modelli animali, monociti infiammatori e residenti sono stati descritti anche nell'uomo (20). Nell'uomo, la situazione è leggermente diversa, cellule CD14⁺/CD16⁻ rappresentano circa tra l'80% e il 90% dei monociti circolanti ed esprimono livelli elevati del recettore CCR2 e bassi livelli di CX3CR1 e pertanto sono simili ai monociti murini Ly6C^{high} (21).

All'opposto cellule CD16⁺ sono anche CX3CR1^{high}/CCR2^{low} e sono paragonabili alla controparte murina Ly6C^{low} tuttavia anche quest'ultimi aumentano in circolo in specifiche condizioni infiammatorie (22).

Recentemente abbiamo inoltre dimostrato come un polimorfismo comune di CX3CR1 che causa ridotta adesività leucocitaria si associ ad una riduzione dello spessore medio-intimale carotideo nella popolazione generale (23), confermando anche nell'uomo un ruolo chiave dei meccanismi di reclutamento monocitario nella patologia vascolare.

Polarizzazione M1/M2 dei macrofagi

Così come per i monociti anche i macrofagi sono presenti in popolazioni con caratteristiche funzionali differenti che dipendono dagli stimoli che li hanno attivati (22).

In risposta a componenti batteriche come LPS o ad interferone γ (IFN γ) i macrofagi vanno incontro all'attivazione classica o M1. Queste cellule producono specie reattive dell'ossigeno, dell'azoto ed IL-12. I macrofagi M1 fanno parte della risposta polarizzata Th1 e sono orientati per mediare la resistenza verso i parassiti intracellulari e i tumori oltre a promuovere

la distruzione dei tessuti danneggiati. L'attivazione alternativa dei macrofagi (M2) ha differenti vie di attivazione: IL-4/IL-13, immunocomplessi, ormoni glucocorticoidi, TGF- β e IL-10. Le cellule M2 sono orientate nel promuovere il rimodellamento tissutale, l'angiogenesi, la regolazione della risposta immune. M1 e M2 producono chemochine differenti, con i primi che rilasciano agonisti di CXCR3 come CXCL9 e CXCL10 mentre i secondi producono agonisti di CCR4 come CCL17 e CCL22.

Il paradigma della polarizzazione M1/M2 va visto alla luce della plasticità e flessibilità delle cellule fagocitiche che rispecchiano la selezione Th1/Th2 dei linfociti ed il bilancio dei principali attivatori IFN γ /IL-4. La relazione tra i subset monocitari e polarizzazione dei macrofagi non è chiara. Nei modelli animali è stato osservato che Ly6C^{high} e Ly6C^{low} differenziano a macrofagi M1 o M2 rispettivamente ma non è chiaro se questo rifletta un pre-commitment o un differente reclutamento temporale. Durante l'aterogenesi prevalgono le cellule Th1 che producono IFN γ , pertanto c'è una prevalenza dei macrofagi M1 che producono citochine pro-infiammatorie. Anche le ox-LDL e i prodotti microbici presenti nelle lesioni sono in grado di attivare e polarizzare i macrofagi verso M1.

All'opposto la presenza di cellule Th2 è stata associata alla prevalenza di polarizzazione M2 che si osserva anche in presenza di alcuni agonisti PPAR γ .

Macrofagi M1 ed M2 pertanto coesistono nell'ateroma (24) rispecchiando la polarizzazione dei macrofagi che si osserva in altri contesti in risposta a fattori immunologici (IFN γ e IL-4), microbici o metabolici (ossisteroli e PPAR γ ligandi). Pertanto i macrofagi presenti nelle placche possono svolgere funzioni pro ed anti-aterogene ed il bilancio tra questi fattori influenza l'evoluzione della placca ateromasica.

Immunità adattativa

Lo studio in modelli murini di aterosclerosi incrociati con topi deficitari delle componenti della risposta immune adattativa hanno potuto confermare sperimentalmente il ruolo generalmente pro-aterogenico della risposta immune adattativa. Tuttavia, alcune critiche sono state mosse ai modelli murini utilizzati, in particolare per la mancanza di predisposizione trombotica delle placche nel topo (25). Novità nella ricerca sulla risposta adattativa nell'aterogenesi e le sue complicanze sono relative a:

- 1) caratterizzazione di diversi subset linfocitari (memoria, Treg);
- 2) modulazione della chemotassi delle cellule mono-linfocitarie;
- 3) contributo dei linfociti B.

Subset linfocitari T

La ricerca sulla risposta adattativa nell'aterogenesi nell'uomo ha evidenziato come la presenza dei linfociti T esprimenti HLA-DR (attivati) (26) o mancanti del recettore CD28 (chiamati CD28null: linfociti T con caratteristiche di cellule memoria) (27) o con ridotta espressione del T-Cell Receptor (TCRdim: anch'essi T con caratteristiche memoria) (28) fosse aumentata nel sangue circolante dei pazienti con sindrome coronarica acuta.

Tali fenotipi di linfociti T, detti memoria perché hanno già incontrato l'antigene, sembrano avere un'aumentata auto-reattività e predisporre l'individuo all'auto-immunità, e sono stati descritti in malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide (29). Inoltre è stato mostrato come i linfociti T HLA-DR+ e i linfociti T CD28null abbiano caratteristiche di oligoclonalità, e cioè un ristretto numero di cloni del TCR specifici per precisi antigeni (26, 27). La presenza di una selezione di cloni a livello delle placche coronariche è stata recentemente con-

fermata sia per le cellule T che per le cellule B (30, 31) suggerendo la possibilità che la placca si possa comportare come una struttura linfoide di nuova formazione, che assomiglia a livello molecolare all'organizzazione delle strutture linfoidi secondarie, come i linfonodi. Recenti studi hanno inoltre dimostrato come nel topo, cellule T CD4+ riconoscano epitopi presenti sulle ApoB100 native e che questa risposta è associata ad un limitato numero di clonotipi del TCR (32).

Recentemente molta attenzione è emersa per un altro subset linfocitario quello dei linfociti T regolatori (Treg). La riduzione delle cellule Treg nel modello murino pronò ad aterosclerosi è associata ad un incremento delle placche (33). Di contro l'induzione, attraverso stimoli differenti, di cellule Treg naturali e antigene-specifiche è associata ad una riduzione dell'aterogenesi nel modello murino. In particolare la somministrazione nasale di una proteina di fusione di un peptide derivato dall'apoB-100 (p210) e la subunità B della tossina colerica ha portato ad una riduzione delle placche aterosclerotiche a 12 settimane nei topi Apoe (-/-) e questo effetto si è accompagnato all'induzione di cellule Treg antigene-specifiche secernenti IL-10 (34). Nell'uomo sono stati valutati i livelli in particolare delle Treg naturali caratterizzate da un fenotipo con alti livelli di espressione del recettore per IL-2 (CD25), bassi livelli del recettore dell'IL-7 (CD127), intermedi livelli di CD4 e presenza intracellulare del fattore trascrizionale FOXP3 (*Figura 2*).

Gli studi hanno condotto a risultati non simili tra loro, e recentemente uno dei primi studi nell'uomo condotto dal nostro gruppo (35) non ha evidenziato che la presenza di livelli ridotti di Treg circolanti si associ ad un'aterosclerosi più marcata, come appariva nel modello murino. Questo può essere spiegato dal fatto che la definizione

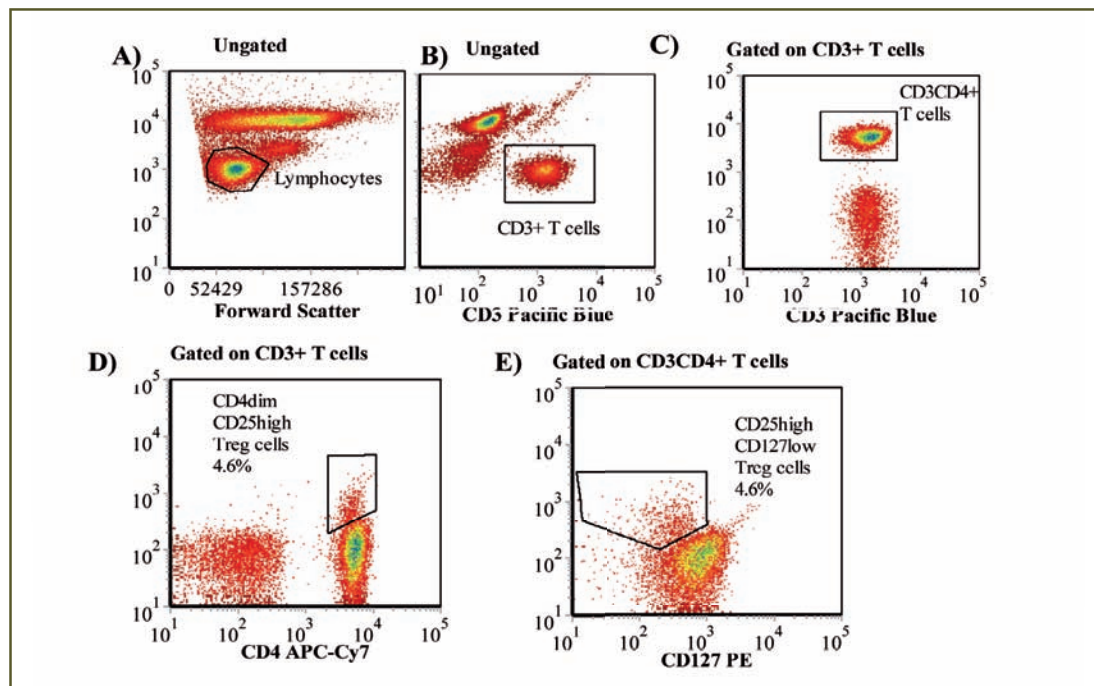


Figura 2 - Identificazione della popolazione T-regolatoria CD3+CD4+CD25^{high}CD127^{low}.

I linfociti vengono identificati ed inseriti elettronicamente nel gate in base ai segnali scatter forward ed orthogonal scatter (A) e la positività a CD3 (componente del recettore dei linfociti T e marcatore dei linfociti T) (B). Le percentuali riportate si riferiscono all'intero setting delle cellule T CD3+CD4+ (C). Dopo il gate delle cellule T CD3+ si procede attraverso due diverse strategie a valutare i livelli di cellule T regolatorie circolanti (D) raggruppando le cellule T CD25^{high} (CD25 è il recettore dell'IL-2) con espressione lievemente ridotta ("dim") di CD4; oppure: (E) raggruppando le cellule T CD3+CD4+CD25^{high}CD127^{low} (CD127 è il recettore dell'IL-7). Le percentuali riportate si riferiscono alla popolazione CD3+CD4+ dei linfociti. Un'elevata correlazione è stata osservata tra cellule CD3+CD4^{dim}CD25^{high} e le cellule CD3+CD4+CD25^{high}CD127^{low}.

di Treg basata sull'espressione di recettori può essere elusiva nell'uomo o che nell'uomo il ruolo delle Treg potrebbe rientrare in uno scenario molto più complesso che nel topo, e quindi avere un ruolo più marginale. Questo dato però sembra mettere in evidenza come la quantificazione delle Treg circolanti, e in particolare il riscontro di valori relativamente bassi, non possa costituire un biomarcatore per individuare i soggetti con maggiore propensione all'aterogenesi (35). La possibilità comunque di poter modulare la risposta infiammatoria delle placche mediante queste cellule responsabili della tolleranza periferica rimane un'affascinante via ancora da comprendere e da validare.

Inibizione della chemiotassi

Il richiamo dei linfociti nelle placche avviene grazie all'azione di recettori di chemiotassi quali: CCR5 e CXCR3. Il blocco dell'azione di questi recettori nei modelli di aterosclerosi si associa ad una riduzione della patologia probabilmente legata all'inibizione del passaggio dei linfociti dal sangue all'interno della lesione (36, 37). CCR5 e CXCR3 costituiscono infatti dei recettori che guidano l'homing dei linfociti T verso i tessuti infiammati. Aumentati livelli di cellule esprimenti questi recettori di chemiotassi sono stati documentati nelle placche aterosclerotiche e anche nelle vasculopatie coronariche dei cuori trapiantati. Numerosi inibitori della chemiotassi

sono stati valutati in modelli animali (38), tuttavia ad oggi non esistono ancora studi dell'uomo che dimostrino l'efficacia di questi farmaci nella patologia aterosclerotica. Alcuni di questi farmaci sono oggi utilizzati nella pratica clinica anche se per patologie differenti; particolarmente promettente sembrano gli antagonisti di CCR5, utilizzati nei pazienti HIV+. Potremmo ricevere a breve informazioni in sottostudi condotti su questi pazienti che sono paradossalmente più predisposti all'aterosclerosi. Infatti nonostante questi pazienti presentino un'immunodeficienza acquisita legata all'infezione del virus, hanno una profonda modificazione dell'assetto lipidometabolico conseguente all'impiego di farmaci attivi contro HIV.

Modulazione dell'attività dei linfociti B

Alcuni studi chiave degli ultimi due anni hanno rivalutato il ruolo dei linfociti B nell'aterosclerosi. Infatti recentemente si è osservato che i linfociti B sono presenti e maturano a livello delle placche aterosclerotiche coronariche, probabilmente sotto lo stimolo di un antigene presente nelle placche (31). Al di là della possibilità di immunizzare i soggetti a rischio di sviluppare aterosclerosi, si è osservato come un'azione diretta sui linfociti B sia in grado di portare a delle conseguenze sullo sviluppo di aterosclerosi. Infatti nel modello murino si è visto come la riduzione dei linfociti B, mediante rituximab (un anticorpo monoclonale contro CD20, che è un marcatore dei linfociti B) è in grado di ridurre l'aterosclerosi (39) aprendo la strada verso un nuovo target di terapia. Il farmaco è già disponibile in commercio e l'eventuale riscontro di livelli di aterosclerosi ridotti in soggetti che fanno uso di rituximab rispetto ad un adeguato gruppo di controllo potrebbe supportare questa ipotesi nell'uomo. Tuttavia, al momento il costo elevato

del farmaco accanto alle conseguenze di un eventuale blocco dell'attività dei linfociti B limita le potenzialità relative all'utilizzo di questo farmaco su ampia scala per ridurre l'aterogenesi.

Conclusioni

L'aumento dell'incidenza di aterosclerosi in numerose patologie a componente immunitaria suggerisce come ci sia una stretta connessione tra le due manifestazioni. La comprensione del ruolo delle componenti immunitarie innate, adattative ed autoimmunitarie nel contesto del modello patofisiologico dell'aterosclerosi è di fondamentale importanza per identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici e suggerire marcatori di attività e di rischio di malattia in grado di migliorare la stratificazione dei pazienti oltre ai normali fattori di rischio.

Nonostante esistano già delle molecole attive sul sistema immunitario che si sono dimostrate efficaci nel rallentare l'aterosclerosi nei modelli animali il loro potenziale utilizzo nell'uomo è limitato oltre che dai costi dei prodotti più nuovi anche dal fatto che non sono noti i potenziali effetti collaterali dell'alterazione di funzionalità del sistema immunitario in pazienti con patologie cardiovascolari.

Sicuramente risulta più applicabile la possibilità di integrare il trattamento delle malattie autoimmuni associate a sviluppo di patologie cardiovascolari con quelle molecole che risultano più efficaci nel controllare la componente immunitaria nelle placche aterosclerotiche. La possibilità di identificare meccanismi più fini o subset cellulari più specifici coinvolti nell'aterogenesi potrebbe portare all'identificazione di bersagli terapeutici più selettivi, il cui blocco od attivazione potrebbe comportare minori effetti collaterali.

Per questo motivo può essere utile avere delle informazioni relative all'assetto fenotipico e funzionale delle diverse componenti cellulari ed umorali dell'immunità innata ed adattativa nelle diverse fasi del processo aterosclerotico sia a livello circolante che a livello locale della placca.

Tali studi andrebbero condotti sia nei soggetti asintomatici con differente profilo di rischio valutando marker surrogati di aterosclerosi subclinica come può essere l'ispessimento medio-intimale carotideo, sia nei pazienti con aterosclerosi sinto-

matica, come ad esempio in pazienti con angina da sforzo con documentate stenosi alla coronarografia o in pazienti con placche carotidee sintomatiche. Questo perché è altamente probabile che in fasi diverse del processo siano attivi meccanismi che sostengono l'aterogenesi o destabilizzano la placca. I nuovi studi nel campo dell'immunità ed aterosclerosi puntano in questa direzione ma nonostante le numerose evidenze precliniche, ci sono ancora numerosi aspetti da analizzare per traslare queste conoscenze nell'uomo.

Elenco degli argomenti trattati/Glossario

Immunità Innata

- Le pentraxine: effettori chiave della risposta immunitaria innata umorale. Sono proteine di fase acute; per alcune di loro come PTX3, il ruolo patofisiologico emerso dagli studi in modelli murini suggerisce un ruolo ateroprotettivo.
- I pattern recognition receptors (PRRs): Superfamiglia di recettori coinvolti nel riconoscimento ed eliminazione del materiale ritenuto dannoso. Esistono due classi principali di PRRs, i recettori endocitici che mediano principalmente l'uptake dell'antigene e i recettori-segnale necessari per l'attivazione della risposta infiammatoria. Al secondo gruppo appartengono i toll-like receptors.
- I subset monocitari circolanti: Esistono subset monocitari sia nei modelli murini che nell'uomo. Nei modelli murini monociti Ly6C^{high}CCR2⁺CX3CR1^{low} sono stati descritti come infiammatori in grado di migrare facilmente nelle arterie prone all'aterosclerosi e differenziarsi a macrofagi. Monociti Ly6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{high} invece sono residenti in circolo, controllano i vasi sanguigni e sono in grado di extravasare durante alcuni tipi di infezione. Nell'uomo popolazioni con simili caratteristiche sono descritte rispettivamente come CD14⁺/CD16⁻ oppure CD14⁻/CD16⁺.
- Polarizzazione M1/M2 dei macrofagi: Due popolazioni macrofagi che con caratteristiche pro-infiammatorie e pro-aterogene o anti-infiammatorie e anti-aterogene descritte come M1 o M2 sono state evidenziate nelle placche aterosclerotiche.

Immunità adattativa

- Subset linfocitari T: Accanto alle classiche distinzioni Th1 e Th2 esistono subset linfocitari come le cellule T-regolatorie oppure linfociti T memoria che influenzano in maniera differente il processo aterogeno.
- Inibizione della chemiotassi: La possibilità di bloccare la chemiotassi dei linfociti nelle lesioni aterosclerotiche attraverso inibizione dei recettori CCR5 o CXCR3 è stata validata nei modelli animali ed è oggetto di studio nell'uomo.
- Modulazione dell'attività dei linfociti B: Il blocco dell'azione dei linfociti B mediante utilizzo di anticorpi monoclonali contro CD20 sembra suggerire un'azione pro-aterogena anche di queste cellule fino ad oggi considerate non particolarmente rilevanti nell'aterosclerosi.

Bibliografia

1. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002; 420(6917): 868-874.
2. Hansson GK and Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2006; 6(7): 508-519.
3. Yan ZQ and Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev*, 2007; 219: 187-203.
4. Stemme S, et al., T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92(9): 3893-3897.
5. Krebs P, et al. Chronic immune reactivity against persisting microbial antigen in the vasculature exacerbates atherosclerotic lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27(10): 2206-2213.
6. Xu XH et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*, 2001; 104(25): 3103-3108.
7. Jonasson L et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 1986; 6(2): 131-138.
8. Hansson GK, Jonasson L. The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009; 29(11): 1714-1717.
9. Norata GD, Garlanda C, Catapano AL. The long pentraxin PTX3: a modulator of the immunoinflammatory response in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med*, 2010; 20(2): 35-40.
10. Salio M et al. Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*, 2008; 117(8): 1055-1064.
11. Norata GD et al. Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; 28(5): 925-931.
12. Norata GD et al. Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2009; 120(8): 699-708.
13. Miller YI et al. Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends Cardiovasc Med*, 2009; 19(7): 227-232.
14. Kiechl S et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*, 2002; 347(3): 185-192.
15. Edfeldt K et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2004; 25(16): 1447-1453.
16. Norata GD et al. Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med*, 2005; 258(1): 21-27.
17. Labrum R et al. Toll receptor polymorphisms and carotid artery intima-media thickness. *Stroke*, 2007; 38(4): 1179-1184.
18. Swirski FK et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytes and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*, 2007; 117(1): 195-205.
19. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol*, 2008; 20(1): 52-60.
20. Passlick B, Flieger D, and Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 1989; 74(7): 2527-2534.
21. Nahrendorf M, Pittet MJ, and Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*, 2010; 121(22): 2437-2445.
22. Mantovani A, Garlanda C, and Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009; 29(10): 1419-1423.
23. Norata GD, et al. Effects of Fractalkine Receptor Variants on Common Carotid Artery Intima-Media Thickness. *Stroke*, 2006; 37(6): 1558-1561.
24. Bouhrel MA, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*, 2007; 6(2): 137-143.
25. Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherosclerosis.

- rogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26(11): 2421-2432.
26. Caligiuri G, et al., Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation*, 2000; 102(10): 1114-1119.
 27. Liuzzo G, et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation*, 1999; 100(21): 2135-2139.
 28. Ammirati E, et al. Expansion of T-cell receptor zeta dim effector T cells in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; 28(12): 2305-2311.
 29. Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*, 2004; 4(9): 675-687.
 30. De Palma R, et al. Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism. *Circulation*, 2006; 113(5): 40-46.
 31. Burioni R, et al. Antigen-driven evolution of B lymphocytes in coronary atherosclerotic plaques. *J Immunol*, 2009; 183(4): 2537-2544.
 32. Hermansson A, et al., Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exp Med*, 2010; 207(5): 1081-10193.
 33. Ait-Oufella H, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*, 2006; 12(2): 178-180.
 34. Klingenberg R, et al. Intranasal immunization with an apolipoprotein B-100 fusion protein induces antigen-specific regulatory T cells and reduces atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010; 30(5): 946-952.
 35. Ammirati E, et al, Circulating CD4+CD25hi CD127lo Regulatory T-Cell Levels Do Not Reflect the Extent or Severity of Carotid and Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010; 30(9): 1832-1841.
 36. van Wanrooij EJ, et al. HIV entry inhibitor TAK-779 attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25(12): 2642-2647.
 37. van Wanrooij EJ, et al. CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; 28(2): 251-257.
 38. Zernecke A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2010; 86(2): 192-201.
 39. Ait-Oufella H, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med*, 2010.

QUESTIONARIO DI AUTO-APPRENDIMENTO

Il tipo di risposta immunitaria che si osserva durante l'aterosclerosi è:

- irrilevante o accessoria
- legata esclusivamente ai monociti/macrofagi.
- innata ed adattativa (X)

I macrofagi sono cellule:

- strutturali della parte vascolare insieme ad endotelio e cellule muscolari lisce
- componenti della risposta immunitaria innata (X)
- producono anticorpi contro LDL-ossidate e patogeni

Le pentraxine sono:

- proteine del signalling intracellulare dei linfociti
- proteine di fase acuta (X)
- componenti delle membrane dei macrofagi e cellule dendritiche

I toll-like receptor sono:

- proteine che attivano la risposta immune ed infiammatoria (X)
- proteine che mediano il trasporto inverso di colesterolo
- recettori dei linfociti associati alla sintesi degli anticorpi

I linfociti T-regolatori sono:

- cellule modulatrici della risposta adattativa (X)
- cellule dell'immunità innata
- cellule responsabili dell'attività pro-aterogena dell'inteleuchina 10