

FISIOPATOLOGIA DELLA PLACCA

TOLLERANZA IMMUNITARIA E ATEROSCLEROSI

Immune tolerance and atherosclerosis

GIORGIA MANNI, FRANCESCA FALLARINO, MARCO GARGARO

Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Perugia

SUMMARY

Cardiovascular diseases, such as myocardial infarction (MI) and stroke, are one of the most prevalent causes of morbidity and mortality worldwide. Atherosclerosis, a pathological process that affects the arterial walls of blood vessels, is the main reason for the onset of these diseases. Atherosclerosis is a systemic inflammatory disease characterized by the accumulation of lipid particles, cells of the immune system, endothelial cells and components of the extracellular matrix, in the subendothelial regions leading to the narrowing of the arterial lumen and the formation of atherosclerotic plaques. These plaques, also called atheromas, can break, leading to reduced blood flow to thrombosis and ischemia. The treatment of these lesions can be performed with surgical techniques such as angioplasty and stenting. In addition to these techniques it is possible to intervene already in the early stages of the onset of atherosclerosis thanks to anti-inflammatory treatments. In fact, clinical observations support a prominent role of systemic inflammation in the pathogenesis of this disease and for this reason treatments have been developed that limit inflammation and have a considerable benefit in the management of various cardiovascular disorders. Moreover, atherosclerosis is currently considered an immune-mediated process given the involvement of many components of the immune system both in the pathogenesis and in the progression of plaque: macrophages that turn into foam cells, autoreactive T cells, autoantibodies, autoantigens and secreted cytokines from cells at sites of inflammation. The involvement of the immune system in the pathogenesis of atherosclerosis offers the possibility of new methods to treat or prevent the development of this disease. Many studies have indicated that immunomodulation and especially the induction of immunological tolerance may have a protective and therapeutic role in atherosclerosis.

Keywords: *Tolerance, atherosclerosis, macrophages, regulatory T cells, immunomodulation.*

Il sistema immunitario nell'aterosclerosi

Nel 19 ° secolo, Rudolf Virchow descrisse l'aterosclerosi come "entzündung" ossia infiammazione (1). Solo nel 1913,

Nikolai Anitschkow dimostrò che un'alimentazione ricca di colesterolo promuove l'aterosclerosi (2). Tuttavia, recentemente è stato delineato un profilo autoimmunitario di tale patologia in cui giocano un ruolo chiave anche i fattori genetici. Studi di associazione *genome-wide* (GWAS) hanno identificato diversi polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) che sono associati ad un aumentato rischio di disfunzione dell'arteria coronaria (3), tra i quali lo SNPs nel *lo-*

Indirizzo per la corrispondenza

Marco Gargaro
Università degli Studi di Perugia,
Dipartimento di Medicina Sperimentale
E-mail: marco.gargaro@unipg.it

cus 9p21 che implica un malfunzionamento del *signaling* dell'IFN γ (4).

Il complesso processo di aterosclerosi ha origine nel momento in cui si verifica l'accumulo nello spazio sub-endoteliale o "intima" di apolipoproteine B contenenti lipoproteine (apoB LP), alterando il diametro del lume delle arterie e di conseguenza il flusso sanguigno (5). Le lipoproteine così intrappolate subiscono modificazioni biochimiche da parte di proteasi e lipasi, portando alla formazione di specie reattive dell'ossigeno e LDL ossidate (oxLDL) che acquisiscono le caratteristiche di *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), i quali a loro volta provocano l'attivazione di una risposta immunitaria innata (6). La risposta immunitaria innata inizia poiché l'accumulo delle oxLDL nell'intima provoca l'espressione di molecole di adesione come VCAM-1 da parte delle cellule endoteliali (7, 8) che richiamano monociti e leucociti. In questi siti la sottopopolazione di monociti Ly6C^{hi} si differenzia in macrofagi che acquisiscono un fenotipo infiammatorio e rappresentano la principale popolazione cellulare della placca. Il continuo accumularsi di lipoproteine porta alla trasformazione dei macrofagi in *foam cells*. Tali cellule, intrappolate all'interno dell'intima arteriosa, perdono la loro capacità migratoria e creano un'area centrale nella placca che consiste di cellule apoptotiche e necrotiche, cristalli di colesterolo e altro materiale extracellulare (9). I macrofagi nelle placche esprimono vari recettori *Toll-like* (TLR) che riconoscono i DAMPs (10, 11), ma anche batteri, tossine e glicoproteine virali (12). L'attivazione dei TLR attiva MYD88 che porta alla secrezione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 β e IL-18 (13). Anche i cristalli di colesterolo contribuiscono all'induzione di un fenotipo pro-infiammatorio dei macrofagi grazie alla loro capacità di attivare i domini NACHT,

LRR e PYD dell'inflammasoma NLRP3 che a sua volta fa rilasciare IL-1 β (14, 15). Inoltre, IL-1 β stimola le cellule muscolari lisce a secernere IL-6 la quale segnala la produzione di proteina C reattiva (PCR) da parte del fegato. Anche le cellule dell'immunità adattativa hanno un ruolo cruciale nella formazione, nella stabilità e nella rottura della placca. Dopo l'attivazione delle cellule dell'immunità innata (macrofagi e cellule dendritiche) si sviluppa anche la risposta immunitaria adattativa che si contraddistingue per l'accumulo di cellule T *helper* (Th), cellule B e per una riduzione delle cellule T regolatorie (T_{reg}) (16). In particolare, si è osservato che la risposta T mediata nell'aterosclerosi presenta un alterato equilibrio tra cellule T effettrici (Th1, Th17) e cellule T_{reg}. I linfociti Th1, secernendo IFN γ , promuovono un'ulteriore attivazione dei macrofagi infiammatori (M1) e contrastano la formazione del cappuccio fibroso della placca degradando il collagene e inibendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Invece le cellule Th17, secernendo IL-17A, promuovono la stabilità della placca favorendo il rilascio e la deposizione di collagene da parte delle cellule muscolari lisce con conseguente aumento della formazione del cappuccio fibroso della placca (17, 18). Questi effetti portano a placche vulnerabili che possono rompersi e causare eventi trombotici. Le cellule T_{reg} e Th migrano nelle lesioni aterosclerotiche in via di sviluppo e modulano il microambiente infiammatorio locale, in gran parte influenzando i fenotipi dei macrofagi. Al contrario, i fenotipi dei macrofagi risolutivi o infiammatori possono spostare l'equilibrio della cellula T della placca verso i fenotipi di T_{reg} e Th, rispettivamente. L'alterazione dell'equilibrio tra le cellule T_{reg} e Th potrebbe riflettersi sulla loro plasticità fenotipica e ciò comporterebbe la ri-differenziazione tra feno-

tipi regolatori e infiammatori. L'equilibrio T_{reg} -Th può anche essere influenzato dalle condizioni metaboliche sistemiche della placca. Anche altre cellule immunitarie, inclusi neutrofili e gli aggregati neutrofilipiastrine, NK (*Natural Killer*), mastociti e eosinofili sono presenti all'interno della lesione aterosclerotica, ma il loro ruolo non è stato ancora definito (16). Oltre alle cellule immunitarie, si verifica l'accumulo nell'intima anche dei miofibroblasti. Queste cellule sono una sorgente di matrice extracellulare che favoriscono la risposta infiammatoria e il danno vascolare (19). In condizioni fisiologiche, dopo il processo infiammatorio, i macrofagi e altre cellule immunitarie secernono molecole in grado di ridurre il processo infiammatorio e favoriscono il riparo tissutale. Una compromessa risoluzione della lesione arteriosclerotica favorisce l'infiammazione cronica che promuove la progressione delle placche e, in particolare nell'uomo, favorisce fenomeni trombotici occlusivi che culminano in eventi cardiovascolari (20-22).

Ruolo dei macrofagi infiammatori nella progressione della placca aterosclerotica

Le funzioni dei macrofagi possono variare ampiamente in base a un numero di variabili e fattori tra cui l'ambiente ("nicchia tissutale") (23, 24), il metabolismo intracellulare (25), i metaboliti del microbiota intestinale (26) e fattori genetici ed epigenetici, inclusi RNA non codificanti (27-30). Tutti questi fattori sono in grado di direzionare le funzioni dei macrofagi verso un fenotipo pro o anti-infiammatorio. In generale, i macrofagi infiammatori M1 svolgono processi che promuovono la progressione dell'aterosclerosi, mentre i macrofagi M2 (risolutivi) svolgono funzioni che possono sopprimere la progressione

della placca o promuoverne la regressione (31). Con la secrezione di citochine, proteasi e altri fattori, i macrofagi infiammatori aumentano l'espansione cellulare delle lesioni e causano cambiamenti morfologici della placca che possono scatenare la rottura della placca e la trombosi acuta. Due cambiamenti chiave promossi da macrofagi infiammatori sono la necrosi della placca e l'assottigliamento del cappuccio fibroso. Al contrario, i macrofagi M2 svolgono funzioni associate alla stabilizzazione della placca. Queste funzioni comprendono: la rimozione delle cellule morte (efferocitosi), che stabilizzano le placche prevenendo la necrosi cellulare post-apoptotica; la secrezione di collagene che può formare una cicatrice protettiva sulla lesione e la produzione di proteine e lipidi che riducono l'infiammazione e promuovono la riparazione dei tessuti. La proporzione relativa di macrofagi con diversi marcatori fenotipici varia a seconda della regione della placca. Ad esempio, i macrofagi infiammatori sono abbondanti in regioni di placca che tendono a rompersi e sono quelli in grado di secernere metalloproteinasi di matrice, MMP2 e MMP9, che potrebbero contribuire alla rottura della placca (32). Al contrario, le placche che appaiono più stabili per la presenza di cappucci fibrosi più spessi e aree di necrosi più piccole, si trovano ad essere arricchite di macrofagi M2 importanti nella regressione di placca e sono in grado di contenere la risposta infiammatoria nel sito lesionato (33).

Ad oggi, rimangono ancora ignoti i meccanismi alla base dell'eterogeneità dei macrofagi nei vari stadi della progressione e della regressione dell'aterosclerosi. Un importante contributo alla proliferazione dei macrofagi infiammatori è dato dal tipo di monociti infiltranti l'endotelio che determinano il loro cambiamento fenotipico. La proliferazione dei macrofagi si verifica

nelle placche avanzate (34, 35), ma i meccanismi e le conseguenze della proliferazione dei macrofagi lesionali rimangono in gran parte sconosciuti. In un recente studio è stata valutato l'effetto della carenza del gene *Zfp148* (zinc finger DNA binding protein 148), che codifica per una proteina che sopprime l'espressione della proteina P53, nelle cellule ematopoietiche di topi *Apoe*^{-/-} (36). In questi topi vi è una diminuzione della proliferazione dei macrofagi lesionali e una marcata diminuzione dei *marker* di infiammazione e dell'area complessiva della lesione in modo dipendente da P53. Sono stati proposti diversi meccanismi che guidano la proliferazione dei macrofagi nell'aterosclerosi, compresa l'attivazione della segnalazione del recettore *scavenger* di classe A, l'attivazione del GTPase Ras e la perdita della funzione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente 2A (CDKN2A) (37, 38). Riguardo all'ipotesi di Ras, uno studio recente ha dimostrato che il trattamento con le statine, inibitori della reduttasi HMG-CoA, bloccando l'attivazione di Ras nei macrofagi lesionali, riduce la loro proliferazione e l'infiammazione della placca (39). Inoltre, la modulazione fenotipica dei macrofagi lesionali può variare anche in base alle condizioni ambientali delle lesioni. Per esempio, l'accumulo di colesterolo in queste cellule può innescare diverse risposte infiammatorie che influenzano la membrana plasmatica attraverso l'attivazione di recettori infiammatori, quali recettori TLR (40). L'accumulo di colesterolo nei macrofagi attiva l'inflammasoma, portando ad un aumento della produzione di IL-1 β pro-aterogenica.

Recenti dati di letteratura hanno dimostrato che la plasticità dei macrofagi nel processo aterosclerotico è dovuta anche a cambiamenti epigenetici nelle prime fasi della differenziazione monociti-macrofa-

gi. Ad esempio, l'esposizione dei monociti alla lipoproteina a bassa densità ossidata (LDL) rende le cellule più responsive ai ligandi dei recettori TLR2 e TLR4 (41). Questa risposta è stata associata ad una modifica epigenetica dell'istone H3K4 nei promotori di molti dei geni infiammatori. Un altro studio ha dimostrato che gli inibitori HDAC3 favoriscono l'espressione dei geni ABCA1 e ABCG1 in macrofagi coltivati *in vitro*, e che la delezione HDAC3 in topi *Ldlr*^{-/-} alimentati con *Western Diet*, sopprime l'aterosclerosi e promuove un ridotto sviluppo dei macrofagi infiammatori (42).

L'equilibrio tra i linfociti T effettori e regolatori condiziona lo sviluppo della placca aterosclerotica

Come per i macrofagi, anche il fenotipo delle cellule T può cambiare in risposta a fattori ambientali che possono alterare le loro capacità di funzionare come cellule regolatrici o infiammatorie. È noto che le cellule T_{reg} hanno proprietà soppressive nella risposta immune, ma in molte malattie autoimmuni assumono un ruolo infiammatorio e patogenetico (43). È stato dimostrato che durante lo sviluppo della lesione aterosclerotica i linfociti T_{reg} diminuiscono ma non quelli effettori (44). Questo fenomeno è associato al fatto che le cellule T_{reg} sono in grado di trasformarsi in cellule con funzioni infiammatorie come dimostrato da recenti studi effettuati su modelli murini. Infatti, recenti studi hanno dimostrato che l'ambiente della placca aterosclerotica e l'ipercolesterolemia condizionano la capacità soppressiva delle T_{reg} che acquisiscono funzioni infiammatorie simili a quella delle cellule Th1. Cellule CD4⁺CD25⁺IFN γ ⁺FoxP3⁺Tbet⁺, denominate Th1-Treg si accumulano nelle lesioni aterosclerotiche di topi *Apoe*^{-/-}. La conver-

sione in cellule Th1-Treg, per contro, non si verifica nei topi C57BL/6 non aterosclerotici (45). Queste cellule mostrano funzioni regolatorie alterate *in vitro* e una ridotta espressione di diversi geni legati alla funzione immunosoppressiva tipici delle T_{reg}. Indipendentemente da questo studio, altri ricercatori hanno dimostrato che il 40% di cellule T CD4⁺ nell'aorta aterosclerotica di topi *ApoE*^{-/-} hanno un fenotipo CCR5⁺ FoxP3⁺ T-bet⁺ e producono IFN- γ e TNF- α (46). Queste cellule, chiamate FoxP3⁺ CCR5⁺ CD25⁺, promuovono l'aterosclerosi in esperimenti di trasferimento adottivo e non sopprimono la proliferazione cellulare delle cellule T effettrici. È interessante notare che, per la delezione del fattore di trascrizione *T-bet*, le cellule Foxp3⁺ perdono il loro fenotipo immunosoppressivo e non sono più in grado di prevenire l'autoimmunità (47). Questa apparente contraddizione nelle funzioni osservate delle cellule T_{reg} che esprimono T-bet potrebbe indicare che lo sviluppo di cellule T_{reg} infiammatorie che esprimono l'IFN γ è legato alle condizioni uniche dell'ipercolesterolemia sistemica o al microambiente della placca. Oltre alla plasticità delle T_{reg}, non va sottovalutata quella degli T effettrici che in molte condizioni patologiche possono differenziarsi, all'interno dei tessuti infiammati, verso fenotipi più patogenetici durante la progressione della malattia. Per esempio, sotto l'influenza di citochine infiammatorie innate, le cellule Th17 protettive perdono la capacità di produrre IL-10 e diventano capaci di produrre IL-22 e IFN γ acquisendo un fenotipo patogenetico (48). Questa conversione di cellule Th17 in cellule effettrici patogenetiche è promossa da IL-1 β , IL-6 e IL-23, citochine note per essere espresse nelle lesioni aterosclerotiche. Il contributo delle cellule Th17 allo sviluppo della lesione aterosclerotica rimane ancora incerto sulla base degli studi effettua-

ti su modelli murini, ma le cellule T che producono IL-17 e IFN γ sono state identificate nelle arterie coronariche umane di pazienti con aterosclerosi (49). Sebbene i linfociti T non accumulino grandi quantità di colesterolo nell'ipercolesterolemia, al contrario dei macrofagi, l'esposizione a oxLDL può indurre profondi effetti sulle funzioni delle cellule T. Data l'importanza del fegato come sito per l'induzione della tolleranza delle cellule T periferiche e dato il suo ruolo centrale nella gestione del colesterolo e nella sintesi delle lipoproteine, è interessante considerare come le cellule T epatiche rispondano ai cambiamenti nell'omeostasi del colesterolo. L'ipercolesterolemia nei topi *Ldlr*^{-/-} alimentati con *Western Diet* è in grado di aumentare il numero di cellule T_{reg} intraepatiche e l'espressione di TGF- β , citochina che guida il differenziamento delle cellule T_{reg} e principale mediatore dell'immunosoppressione (50). Esperimenti di trasferimento adottivo hanno dimostrato che queste cellule T_{reg} epatiche si ritrovano nell'aorta aterosclerotica. Inoltre, l'ipercolesterolemia induce la differenziazione delle cellule T epatiche Th1 o Th17 a seconda della presenza o assenza dei recettori LDL. Questi dati suggeriscono che i cambiamenti sistemici nel metabolismo delle lipoproteine e nel colesterolo alimentare potrebbero cambiare il rapporto tra i sottogruppi di cellule T_{reg} e Th generati nel fegato, il che cambierebbe i rapporti delle cellule che entrano nelle placche.

Inoltre, i meccanismi mediante i quali l'ipercolesterolemia potrebbe influenzare la differenziazione delle cellule T_{reg} o T_{eff} molto probabilmente implicano effetti legati alle cellule dendritiche (DC). Queste cellule si trovano nelle regioni soggette a aterosclerosi prima dello sviluppo della lesione e assorbono rapidamente le oxLDL (51). Le DC mantengono le loro funzioni

di presentazione dell'antigene dopo essere diventate *foam cells* (52) e rispondono all'accumulo di colesterolo aumentando la produzione di citochine che guidano la differenziazione dei sottogruppi di cellule Th (53). Tuttavia, sembrano esserci anche effetti diretti del colesterolo sulle cellule T. Ad esempio, le cellule T di topi carenti del trasportatore di colesterolo ABCG1 (ATP-binding cassette (ABC) transporters) mostrano aumentate risposte proliferative alla stimolazione del TCR e la delezione selettiva delle cellule T di ABCG1 determina un aumento della differenziazione delle cellule T_{reg} dalle cellule T *naive* (54). L'attivazione delle cellule T richiede l'assemblaggio del recettore-antigene e di altre molecole di segnalazione in zattere lipidiche ricche di colesterolo, che è un prerequisito per la formazione di sinapsi immunitarie con cellule presentanti l'antigene. Pertanto, alterazioni nel colesterolo cellulare potrebbero influenzare l'attivazione delle cellule T a causa dei cambiamenti nella formazione della zattera lipidica. È stato dimostrato che la funzione antitumorale delle cellule T CD8⁺ incrementa in topi in cui il contenuto di colesterolo non esterificato nella membrana cellulare è elevato. Pertanto, l'impatto immunologico netto dei cambiamenti nel colesterolo delle cellule T sembra variare a seconda del compartimento intracellulare interessato e del sottogruppo delle cellule T.

Aterogenesi e immunotolleranza

La malattia vascolare aterosclerotica rimane la principale causa di morte nel mondo industrializzato e la sua incidenza dovrebbe aumentare nei prossimi 20 anni (55, 56). Negli ultimi anni sta emergendo l'idea di aterosclerosi come patologia immuno-mediata e per questo la compren-

sione dei modi in cui l'immunità innata e adattativa influenzano tale patologia sta continuato a evolversi insieme alle aree emergenti nella ricerca immunologica.

Nel presente lavoro, abbiamo enfatizzato soprattutto la dinamica e l'eterogeneità dei macrofagi e delle cellule T e il modo in cui questi tipi cellulari influiscono sull'equilibrio tra progressione e risoluzione dell'infiammazione della placca. Queste aree emergenti di indagine hanno sollevato nuove domande, ma hanno anche convalidato gli attuali sforzi per modificare gli approcci terapeutici esistenti e sviluppare nuove strategie. L'osservazione della patogenesi dell'aterosclerosi come reazione immunologica agli LP apoB nella parete arteriosa enfatizza l'importanza fondamentale e il successo delle terapie plasmatiche mirate ad abbassare i livelli di apoB-LP, incluse statine e inibitori di PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type) (57). Abbassando la concentrazione di LP di apoB nel sangue si ha una riduzione della loro infiltrazione nelle lesioni in via di sviluppo e in questo modo queste terapie riducono il carico di DAMP e antigeni che causano risposte immunitarie innate e adattive nell'arteria. Inoltre, l'ipercolesterolemia può promuovere l'attivazione aterogenica delle cellule immunitarie circolanti e dei loro precursori prima ancora che entrino nella lesione. Se gli LP di apoB ricchi di colesterolo fossero abbassati al di sotto di una determinata soglia, si arresterebbe la progressione della placca e ciò indurrebbe la regressione. Tuttavia, questo potenziale non è stato raggiunto a causa di una serie di problemi, un esempio dei quali è l'effetto contrastante dell'insulino-resistenza indotta dall'obesità. La resistenza all'insulina è un potente fattore di rischio per la cardiopatia ischemica a causa dei suoi legami con la dislipidemia e l'infiammazione (58, 59).

Terapie mirate contro le citochine, come gli antagonisti del TNF o dell'IL-17, hanno trasformato il trattamento delle malattie autoimmuni, tra cui l'artrite reumatoide e la psoriasi. Queste malattie comportano un aumento del rischio cardiovascolare, ma non è chiaro se le terapie anti-citochine utilizzate per ridurre la patologia autoimmune influenzino direttamente l'infiammazione e la progressione della placca. Lo studio CANTOS (*Anti-inflammatory Outcomes Study*), recentemente completato, ha sperimentato un anticorpo IL-1 β -bloccante (*Canakinumab*). Questo è il primo studio clinico sull'efficacia di una terapia anti-citochina somministrata esplicitamente per le malattie cardiovascolari (60). Rispetto al placebo, è stato dimostrato che il trattamento di oltre 10.000 pazienti con *Canakinumab* riduce il rischio di infarto miocardico, ictus e morte cardiovascolare del 15%. Il trattamento con *Canakinumab* ha ridotto significativamente le concentrazioni di PCR e IL-6 nel siero, ma non ha avuto effetti sui lipidi, suggerendo che la riduzione del rischio cardiovascolare era direttamente correlata agli effetti anti-infiammatori.

Esiste anche la prova che le condizioni metaboliche possono indurre cambiamenti epigenetici nei macrofagi e quindi portare a una forma di memoria immunitaria innata (61, 62) che potrebbe promuovere la progressione della lesione. A questo proposito è stato dimostrato l'effetto di inibizione dell'espressione genica dell'infiammazione, attraverso l'utilizzo di modulatori epigenetici fisiologici (ad esempio inibitori delle proteine del bromodominio e del motivo extra-terminale, BET), che sono in grado di ridurre l'arteriosclerosi (63, 64).

Molti studi preclinici hanno convalidato il concetto di trattare l'arteriosclerosi con vaccinazioni terapeutiche che tolle-

rano gli antigeni che guidano le risposte pro-aterogenetiche delle cellule T. Recenti progressi in questo campo includono l'identificazione di epitopi peptidici apoB100 che legano le glicoproteine complesse di istocompatibilità (MHC) del tipo o della classe II umana e la dimostrazione che la vaccinazione di topi che esprimono molecole MHC in grado di legare il peptide riduce la formazione di lesioni aterosclerotiche (65, 66). Queste evidenze sugge-

Glossario

GWAS: *Genome Wide Association Study*.

Studio prospettico effettuato in larga scala che consiste nell'indagare tutti (o quasi tutti) i geni di diversi individui di una popolazione al fine di determinare le variazioni geniche tra gli individui in esame. In seguito, si associano le differenze osservate ad una malattia.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*. Sono polimorfismi a singolo nucleotide, ovvero variazioni di un singolo nucleotide (Adenina, Citosina, Timina, Guanina) presenti in determinati tratti di DNA e costituiscono strumenti fondamentali per variati studi di genetica.

DAMP: *Damage-associated molecular patterns*. Molecole rilasciate da cellule danneggiate chiamate anche "profili molecolari associati al danno" che sono riconosciute dall'immunità innata (macrofagi e cellule dendritiche) che quindi viene quindi stimolata ad eliminare le cellule danneggiate.

NLRP3: L'inflammasoma *Nod-like receptor pyrin domain containing protein 3* (NLRP3) è un complesso proteico multimerico formato da NLRP3, dalla proteina adattatrice ASC e dalla caspasi 1. Stress, patogeni e sostanze tossiche sono in grado di attivare l'inflammasoma, portando all'attivazione della caspasi 1 e alla successiva maturazione dell'interleuchina-18 (IL-18) e interleuchina-1 β (IL-1 β).

riscono che la modulazione dell'sistema immunitario induce meccanismi di protezione mediati dall'induzione delle cellule T_{reg} (66) o dall'inibizione dell'attivazione dei macrofagi attraverso l'uso di anticorpi monoclonali anti-PCSK9 che bloccano l'interazione delle LDL con il proprio recettore (65).

Conclusioni

L'immunomodulazione presenta un grande potenziale per il trattamento dell'aterosclerosi nell'uomo, sebbene finora sia stata testata solo in modelli animali. Studi sperimentali e dati osservazionali hanno fornito gli elementi essenziali per l'identificazione di potenziali *target* per il trattamento dell'aterosclerosi. La riduzione dell'infiammazione può essere raggiunta attraverso l'inibizione di mediatori dell'infiammazione oppure attraverso l'induzio-

ne dell'immunotolleranza. Nonostante i risultati incoraggianti derivati da studi retrospettivi osservazionali con inibitori dei mediatori dell'infiammazione (anti-TNF- α nell'artrite reumatoide), diversi *trials* clinici hanno evidenziato la scarsa attività di queste molecole nel trattamento dell'aterosclerosi. Infatti, in molti di questi studi si è osservato un incremento dei rischi associati al trattamento anti-infiammatorio rispetto ai benefici, tra questi ritroviamo il trattamento con inibitori della COX-2 e anti-IL-12/IL-23 p40. Questi dati enfatizzano la complessità della risposta infiammatoria nell'aterosclerosi. Pertanto, un'approfondita conoscenza sui meccanismi cellulari e molecolari che si verificano in ogni stadio dell'aterosclerosi potrebbero essere utili per predire come specifici trattamenti anti-infiammatori possono condizionare l'inizio e la progressione della patologia.

RIASSUNTO

Le malattie cardiovascolari, quali infarto del miocardio (MI) e *ictus*, rappresentano una delle cause più prevalenti di morbilità e mortalità in tutto il mondo. L'aterosclerosi, processo patologico che colpisce le pareti arteriose dei vasi sanguigni, rappresenta il principale motivo dell'insorgenza di queste malattie. L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria sistemica caratterizzata dall'accumulo di particelle lipidiche, cellule del sistema immunitario, cellule endoteliali e componenti della matrice extracellulare, nelle regioni sub-endoteliali che portano al restringimento del lume arterioso e alla formazione delle placche aterosclerotiche. Queste placche, dette anche ateromi, possono rompersi portando alla riduzione del flusso sanguigno, alla trombosi e all'ischemia. Il trattamento di queste lesioni può essere eseguito con tecniche chirurgiche come angioplastica e *stenting*. Oltre a queste tecniche è possibile intervenire già nelle prime fasi dell'insorgenza dell'aterosclerosi grazie a trattamenti anti-infiammatori. Infatti, osservazioni cliniche sostengono un ruolo di primo piano dell'infiammazione sistemica nella patogenesi di questa malattia e per tale ragione sono stati sviluppati trattamenti che limitando l'infiammazione hanno un notevole beneficio nella gestione di diversi disturbi cardiovascolari. Inoltre, attualmente l'aterosclerosi è considerato un processo immuno-mediato dato il coinvolgimento di molti componenti del sistema immunitario sia nella patogenesi che nella progressione della placca: macrofagi che si trasformano in cellule schiumose, linfociti T autoreattivi, autoanticorpi, autoantigeni e citochine secrete dalle cellule nei siti di infiammazione. Il coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi dell'aterosclerosi offre la possibilità di nuovi metodi per trattare o prevenire lo sviluppo di questa malattia. Molti studi hanno indicato che l'immunomodulazione e soprattutto l'induzione della tolleranza immunologica possono avere un ruolo protettivo e terapeutico nell'aterosclerosi.

Parole chiave: Tolleranza, aterosclerosi, macrofagi, cellule T regolatorie, immunomodulazione.

Bibliografia

- Virchow R. in *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin* (Meidinger & Sohn Corp, 1856).
- Anitschkoff N. Über Veränderungen der Kaninchen-Aorta bei experimentelle Cholesterolinsteatose. *Beitr. Path. Anat.* 56: 379-391 (in German). 1913.
- Schunkert H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat. Genet.* 2011; 43: 333-338.
- Harismendy O, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature.* 2011; 470: 264-268.
- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 551-561.
- Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 2011; 12: 204-212.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991; 251: 788-791.
- Nakashima Y, et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 842-851.
- Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 136-145.
- Miller YI, et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/ MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 1561-1568.
- West XZ, et al. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature* 2010; 467: 972-976.
- Lundberg AM, Hansson GK. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin. Immunol.* 2010; 134: 5-24.
- Bjorkbacka H, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat. Med.* 2004; 10: 416-421.
- Duewell P, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010; 464: 1357-1361.
- Rajamaki K, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS ONE* 5, e11765. 2010.
- Witztum JL, Lichtman AH. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* 2014; 9: 73-102.
- Lim H, et al. Proatherogenic conditions promote autoimmune T helper 17 cell responses in vivo. *Immunity.* 2014; 40: 153-165.
- Eid RE, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2009; 119: 1424-1432.
- Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118: 692-702.
- Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, et al. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J.* 2008; 22: 3595-3606.
- Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 36-46.
- Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. *Semin. Immunol.* 2015; 27: 184-193.
- Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell.* 2014; 159: 1327-1340.
- Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell.* 2014; 159: 1312-1326.
- Van den Bossche J, O'Neill LA, et al. Macrophage immunometabolism: Where are we (going)? *Trends Immunol.* 2017; 38: 395-406.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011; 472: 57-63.
- Erbilgin A, Civelek M, Romanoski CE, et al. Identification of CAD candidate genes in GWAS loci and their expression in vascular cells. *J. Lipid Res.* 2013; 54: 1894-1905.
- Chen HH, Keyhanian K, Zhou X, et al. IRF2BP2 reduces macrophage inflammation and susceptibility to atherosclerosis. *Circ. Res.* 2015; 117: 671-683.
- Wu XQ, Dai Y, Yang Y, et al. Emerging role of microRNAs in regulating macrophage activation and polarization in immune response and inflammation. *Immunology.* 2016; 148: 237-248.
- Amit I, Winter DR, et al. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* 17, 18-25 (2016).
- Peled M, Fisher EA. Dynamic aspects of mac-

- rophage polarization during atherosclerosis progression and regression. *Front. Immunol.* 2014; 5: 579.
32. Huang WC, Sala-Newby GB, Susana, et al. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *PLoS ONE.* 2012; 7: e42507.
 33. Trogan E, Feig JE, Dogan S, et al. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 3781-3786.
 34. Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, et al. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000; 11: 503-509.
 35. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* 2013; 19: 1166-1172.
 36. Sayin VI, Khan OM, Pehlivanoglu LE, et al. Loss of one copy of Zfp148 reduces lesional macrophage proliferation and atherosclerosis in mice by activating p53. *Circ. Res.* 2014; 115: 781-789.
 37. Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, et al. Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 6627-6633.
 38. Kuo CL, Murphy AJ, Sayers S, et al. Cdkn2a is an atherosclerosis modifier locus that regulates monocyte/macrophage proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 2483-2492.
 39. Tang J, Lobatto ME, Hassing L, et al. Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Sci. Adv.* 2015; 1: e1400223.
 40. Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, et al. ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ. Res.* 2014; 114: 157-170.
 41. Bekkering S, van den Munckhof I, Nielen T, et al. Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. *Atherosclerosis.* 2016; 254: 228-236.
 42. Hoeksema MA, Gijbels MJ, Van den Bossche J, et al. Targeting macrophage Histone deacetylase 3 stabilizes atherosclerotic lesions. *EMBO Mol. Med.* 2014; 6: 1124-1132.
 43. Sawant DV, Vignali DA. Once a Treg, always a Treg? *Immunol. Rev.* 2014; 259: 173-191.
 44. Maganto-Garcia E, Tarrío ML, Gräbie N, et al. Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation.* 2011; 124: 185-195.
 45. Butcher MJ, Filipowicz AR, Waseem TC, et al. Atherosclerosis driven Treg plasticity results in formation of a dysfunctional subset of plastic IFN γ ⁺ Th1/Tregs. *Circ. Res.* 2016; 119: 1190-1203.
 46. Li J, McArdle S, Gholami A, et al. CCR5⁺T-bet⁺FoxP3⁺ effector CD4 T Cells drive atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118: 1540-1552.
 47. Levine AG, Medoza A, Hemmers S, et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature.* 2017; 546: 421-425.
 48. Burkett PR, Meyer zu Horste G, Kuchroo VK. Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 2015; 125: 2211-2219.
 49. Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2009; 119: 1424-1432.
 50. Mailer R KW, Gistera A, Polyzos KA, et al. Hypercholesterolemia induces differentiation of regulatory T cells in the liver. *Circ. Res.* 2017; 120: 1740-1753.
 51. Paulson KE, Zhu SN, Chen M, et al. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ. Res.* 2010; 106: 383-390.
 52. Packard RR, Maganto-García E, Gotsman I, et al. CD11c(+) dendritic cells maintain antigen processing, presentation capabilities, and CD4(+) T-cell priming efficacy under hypercholesterolemic conditions associated with atherosclerosis. *Circ. Res.* 2008; 103: 965-973.
 53. Westerterp M, Gautier EL, Ganda A, et al. Cholesterol accumulation in dendritic cells links the inflammasome to acquired immunity. *Cell Metab.* 2017; 25: 1294-1304.e6.
 54. Armstrong AJ, Gebre AK, Parks JS, et al. ATP-binding cassette transporter G1 negatively regulates thymocyte and peripheral lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 2010; 184: 173-183.
 55. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee Executive summary: heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2013; 127: 143-152.
 56. American Heart Association; American Stroke Association. Cardiovascular Disease: A Costly Burden for America-Projections through 2035. https://www.heart.org/idc/groups/heart-public/@wcm/@adv/documents/downloadable/ucm_491543.pdf. 2017.
 57. Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogen-

- esis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr. Opin. Lipidol.* 2016; 27: 473-483.
58. Razani B, Chakravarthy MV, Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2008; 37: 603-621.
 59. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.* 2011; 14: 575-585.
 60. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Anti-inflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 1119-1131 CANTOS Trial Group. 2017.
 61. Netea MG, Joosten LA, Latz E, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352, aaf1098. 2016.
 62. Phan AT, Goldrath AW, Glass CK. Metabolic and epigenetic coordination of T cell and macrophage immunity. *Immunity.* 2017; 46: 714-729.
 63. Brown JD, Lin CY, Duan Q, et al. NF- κ B directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Mol. Cell.* 2014; 56: 219-231.
 64. Jahagirdar R, Zhang H, Azhar S, et al. A novel BET bromodomain inhibitor, RVX-208, shows reduction of atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis.* 2014; 236: 91-100.
 65. Gisterà A, Hermansson A, Strodtzoff D, et al. Vaccination against T-cell epitopes of native ApoB100 reduces vascular inflammation and disease in a humanized mouse model of atherosclerosis. *J. Intern. Med.* 2017; 281: 383-397.
 66. Kimura T, Tse K, McArdle S, et al. Atheroprotective vaccination with MHC-II-restricted ApoB peptides induces peritoneal IL-10-producing CD4 T cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2017; 312: H781-H790.