



SAPIENZA
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE
XXXI CICLO**

**“SOTTOPOPOLAZIONI MONOCITARIE E LINFOCITARIE NELLA
STENOSI CAROTIDEA CRITICA SINTOMATICA E ASINTOMATICA
E NELLA DISSECAZIONE ACUTA DELL’AORTA”**

DOTTORANDA

Sara Perrotta

DOCENTE GUIDA

Chiar.mo Prof. Maurizio Taurino

**COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Maurizio Sorice**

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

Indice

<i>Introduzione</i>	4
----------------------------	---

Capitolo I

L'Aterosclerosi

1. L'eziologia dell'Aterosclerosi e i principali fattori di rischio	6
2. Le arterie da un punto di vista microscopico	7
3. Patogenesi e decorso dell'Aterosclerosi	10
4. L'American Heart Association (AHA) classifica le lesioni aterosclerotiche	14
5. La fisiopatologia dell'Aterosclerosi e le sue manifestazioni cliniche	17
6. La dissecazione acuta dell'aorta ascendente come una delle conseguenze della patologia aterosclerotica	21
7. I meccanismi molecolari che caratterizzano il processo di dissecazione acuta dell'aorta ascendente	23

Capitolo II

L'Aterosclerosi e il ruolo del Sistema Immunitario

1. Il processo infiammatorio e le sue fasi	25
2. L'immunopatologia cellulare e molecolare dell'Aterosclerosi	27
2.1 La risposta immunitaria innata e l'innescamento del processo aterosclerotico	29
2.2 Il ruolo della risposta immunitaria adattativa nell'Aterosclerosi	33
3. L'interazione tra l'immunità innata e adattativa nel processo aterosclerotico	37

Capitolo III

<i>Scopo del lavoro</i>	40
--------------------------------	----

Capitolo IV

Materiali e metodi

1. Popolazione di studio	42
2. Estrazione dei PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) dal sangue periferico	44
3. Analisi FACS delle popolazioni immunitarie di studio	44
3.1 Marcatura dei subsets monociti per l'analisi al FACS	45
3.2 Marcatura dei linfociti Th17 per l'analisi al FACS	46
3.3 Marcatura dei linfociti T regolatori per l'analisi al FACS	47
3.4 Marcatura dei linfociti B per l'analisi al FACS	48
4. Analisi statistica dei dati	48

Capitolo V

Risultati

1. Analisi delle sottopopolazioni monocitarie	49
2. Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie CD4+	52
2.1 Analisi dei linfociti T helper 17	53
2.2 Analisi dei linfociti T regolatori FoxP3+ e LAG3 +	55
3. Analisi dei linfociti B	58

Capitolo VI

<i>Conclusioni</i>	60
---------------------------	----

<i>“Regulatory T CD4+ CD25+ lymphocytes increase in symptomatic carotid artery stenosis”</i>	65
--	----

<i>Bibliografia</i>	75
----------------------------	----

Introduzione

L'Aterosclerosi è tra i principali fattori di rischio di patologie che affliggono il sistema cardiovascolare, come l'infarto e l'ictus, che ad oggi rappresentano alcune delle più comuni cause di morte nel mondo occidentale, destinate a diventare nel tempo uno dei problemi più significativi per la salute. Per questo la comprensione di meccanismi alla base dell'insorgenza e progressione della patologia aterosclerotica sono fondamentali per lo sviluppo di possibili target terapeutici.

La definizione dell'aterosclerosi è abbastanza complessa essendo essa una patologia multifattoriale. In generale, è definita come una patologia infiammatoria cronica caratterizzata dall'accumulo di colesterolo, lipidi e matrice connettivale che si verifica in seguito a danno endoteliale, a livello della tonaca intima della parete delle arterie di grande e medio calibro di tipo elastico, quali aorta, carotide, coronarie ed arterie cerebrali. Solo negli ultimi anni è emerso il ruolo chiave del sistema immunitario nella patogenesi e nel decorso dell'aterosclerosi e come questo sia in grado di orientare la progressione del processo aterosclerotico verso la formazione di placche stabili o instabili, andando quindi ad influenzare la vulnerabilità della stessa, oppure orientare il processo di degradazione della parete arteriosa che inizia nella tonaca intima e si propaga fino alla tonaca media causando la dissecazione.

Le principali cellule del sistema immunitario coinvolte sono i monociti-macrofagi e linfociti T che si accumulano a livello della placca aterosclerotica. La migrazione e infiltrazione di queste cellule causa un ispessimento della tonaca intima con conseguente diminuzione del calibro del vaso e riduzione dell'apporto di sangue, e quindi di ossigeno, ai tessuti a valle. L'infiltrazione leucocitaria induce così una risposta infiammatoria che, se non viene risolta, diventa cronica e porta alla rottura della placca, alla formazione di un trombo e all'ischemia dell'organo interessato. È importante notare che la risposta immunitaria attivata comprende sia cellule dell'immunità innata che si attiva per prima, che di quella adattativa che è più tardiva. Diversi studi sono stati effettuati e sono in corso sulle componenti cellulari del sistema immunitario coinvolte nella patogenesi e nel decorso dell'aterosclerosi. Infatti, l'alterazione dei livelli delle sottopopolazioni monocitarie è associata all'insorgenza di diverse patologie cardiovascolari come l'aterosclerosi e l'equilibrio tra attivazione ed inibizione dei subsets monocitari con attività infiammatorie opposte regola la progressione della lesione

aterosclerotica verso una placca stabile o instabile. In particolare, i monociti CD16+ svolgono un'attività prettamente pro-infiammatoria e sono correlati ad un aumento del rischio di sviluppare eventi cardiovascolari (Yamamoto H et al. 2018). I monociti circolanti migrano a livello della lesione aterosclerotica, differenziano in macrofagi e rilasciano citochine e chemochine che richiamano ed attivano i linfociti nel sito dell'infiammazione.

Inizialmente un ruolo chiave è stato attribuito ai linfociti T helper 1 (Th1) e 2 (Th2): i linfociti Th1 producono le citochine pro-infiammatorie IFN- γ e TNF- α che alimentano il processo aterosclerotico, mentre i linfociti Th2 producono IL-4 e IL-10 che invece lo inibiscono (Cheng X. Et al. 2008). Recentemente, è emerso che altre popolazioni linfocitarie sono coinvolte nel processo aterosclerotico; tra queste sembrano svolgere un ruolo cruciale i linfociti Th17 e i linfociti Treg. I linfociti Th17 secernono IL-17, una citochina con attività pro-infiammatoria e promuovono l'aterogenesi, mentre i linfociti Treg secernono citochine anti-infiammatorie, come IL-10, ed hanno un effetto protettivo sulla progressione della lesione (Zhen-Dong Liu et al. 2012). Molto interessante è stata la scoperta che alterazioni nel rapporto dei subsets monocitari e di alcune popolazioni linfocitarie possono essere alla base di diverse patologie infiammatorie, tra cui l'aterosclerosi appunto, ed essere considerate marker di riferimento per individuare e prevenire le deleterie conseguenze della patologia aterosclerotica stessa (Zhen-Dong Liu et al. 2012).

Capitolo I

L'Aterosclerosi

1.L'eziologia dell'Aterosclerosi e i principali fattori di rischio

L'aterosclerosi è una malattia multifattoriale e, nonostante non sia mai stata identificata un'unica causa scatenante la patologia, sicuramente è chiaro che le condizioni e le abitudini di vita aumentano significativamente la probabilità di svilupparla. Numerosi sono i fattori di rischio individuati e che possono essere suddivisi in acquisiti e costituzionali. Tra i fattori di rischio acquisiti, i principali sono l'ipercolesterolemia e l'ipertensione arteriosa. L'ipercolesterolemia, un'elevata concentrazione di colesterolo e lipoproteine a bassa densità (LDL) nel sangue, è dovuta principalmente ad una dieta troppo ricca di grassi oppure ad un difetto ereditario, noto come l'ipercolesterolemia familiare. A tale proposito Guardamagna O. e collaboratori (Guardamagna O. et al. 2009) hanno dimostrato che in bambini affetti da ipercolesterolemia familiare lo spessore della tonaca intima e media dell'arteria carotidea (IMT) è maggiore rispetto a quello di un bambino sano; inoltre è stato evidenziato che nei bambini malati le piastrine e le cellule endoteliali durante il processo infiammatorio esprimono un marker di attivazione sulla loro superficie, la P-selectina.

La pressione arteriosa è la forza esercitata dal sangue contro la parete delle arterie. Si definisce ipertensione la condizione in cui la pressione è costantemente superiore a 90/140 mmHg. Essa causa la riduzione della sintesi di ossido nitrico (NO), un potente vasodilatatore prodotto dalle cellule endoteliali, mediante l'inibizione dell'enzima NO sintetasi endoteliale (eNOS), e l'aumento della sua degradazione, determinando una sovrapproduzione di radicali liberi dell'ossigeno mediante meccanismi enzimatici, quali l'attivazione della protein chinasi C (PKC) e della NADPH ossidasi (nicotinamide adenin dinucleotide fosfato ridotta) (Nishikawa T. et al. 2000).

Non meno importante è il diabete mellito di tipo I, una patologia autoimmune in cui il sistema immunitario attacca e distrugge le cellule beta delle isole di Langerhans del pancreas che normalmente producono insulina. L'insulina è un ormone che stimola l'entrata di glucosio dal torrente sanguigno nelle cellule dei tessuti dove viene utilizzato per il metabolismo cellulare. La mancanza di insulina provoca l'iperglicemia, un'elevata concentrazione ematica di glucosio, che causa a sua volta la diminuzione della sintesi di NO da parte delle cellule endoteliali. Ciò porta ad un aumento di radicali liberi dell'ossigeno attraverso meccanismi non

enzimatici di stress ossidativo e, in particolare, favorisce la produzione di prodotti terminali della glicosilazione avanzata (advanced glycation end-products, AGE) (Tan KC et al. 2002). Questi ultimi sono complessi macromolecolari proteici (ad esempio l'emoglobina glicosilata) ma anche lipidici, per i quali le cellule possiedono specifici recettori. L'interazione tra AGE e i loro recettori stimola la produzione di citochine proinfiammatorie, contribuisce alla disfunzione endoteliale e determina l'espressione di molecole di adesione leucocitaria implicate nell'aterogenesi (Brownlee M. et al. 2000).

Anche il fumo di sigaretta inibisce la produzione di NO, provoca l'aumento dei livelli di colesterolo, della pressione sanguigna e dello stato infiammatorio a livello vascolare (Mariann R. Piano et al. 2010).

Infine, l'obesità e la mancanza di attività fisica contribuiscono all'insorgenza dell'ipercolesterolemia.

I fattori di rischio costituzionali sono l'età, il sesso, la razza e la familiarità.

Il rischio di sviluppare l'aterosclerosi aumenta con l'età in quanto la placca si sviluppa lentamente nel tempo ed in età avanzata può aver raggiunto un volume tale da provocare segni o sintomi clinici. In particolare, negli uomini il rischio aumenta dopo 45 anni, mentre nelle donne dopo i 55 anni.

La popolazione occidentale, a causa di una dieta molto più ricca di grassi, risulta maggiormente predisposta allo sviluppo della malattia aterosclerotica.

Infine, il rischio di insorgenza di aterosclerosi aumenta se ad un familiare è stata diagnosticata una malattia cardiovascolare prima dei 60 anni di età.

2. Le arterie da un punto di vista microscopico

L'apparato cardiocircolatorio media il movimento di tutti i fluidi del corpo; le sue principali funzioni sono il trasporto di ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti e il trasporto di anidride carbonica e prodotti di scarto del metabolismo cellulare fuori dai essi. Il sistema circolatorio è anche coinvolto nella termoregolazione e nel trasporto di molecole, tra cui gli ormoni, e di cellule, ad esempio quelle del sistema immunitario.

Il sistema circolatorio comprende due componenti funzionali: il sistema vascolare ematico e il sistema vascolare linfatico.

Il sistema vascolare ematico è costituito da un sistema di vasi attraverso i quali il sangue

circola spinto dalla contrazione cardiaca. Il sistema arterioso comprende una fitta rete di vasi di diametro via via decrescente che portano sangue ossigenato fino ai capillari, i principali siti di scambio tra i tessuti ed il sangue. Il sistema venoso riporta il sangue ricco di anidride carbonica dai capillari al cuore. Il sistema linfatico, invece, è semplicemente un sistema di drenaggio passivo che permette il ritorno al circolo ematico del fluido extravascolare in eccesso, la linfa.

I vasi hanno una struttura di base comune (*Figura 1.1*); a partire dal lume del vaso presenta:

- **tonaca intima**, formata dall'**endotelio**, sostenuto da una membrana basale e da tessuto connettivo;
- **tonaca media**, uno strato intermedio formato da tessuto muscolare liscio;
- **tonaca avventizia**, uno strato di tessuto connettivale esterno.

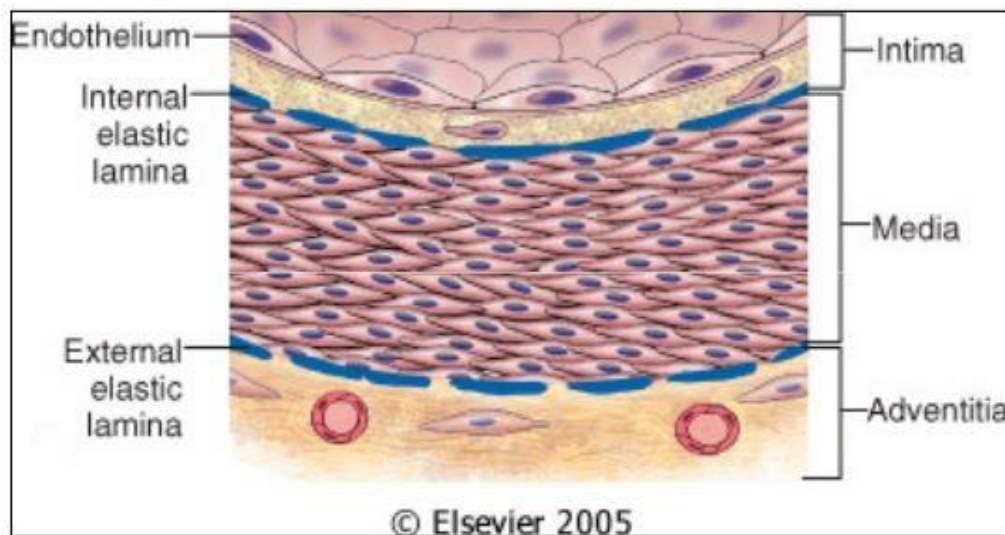


Figura 1.1 Struttura base dei vasi

L'**endotelio** forma il rivestimento interno dei vasi ed è formato da un singolo strato di cellule epiteliali di forma allungata ed estremamente appiattite caratterizzate dalla presenza di complessi giunzionali tra cellule vicine.

Le cellule endoteliali svolgono diverse funzioni:

- mantenimento della barriera di permeabilità;
- regolazione del flusso ematico attraverso la produzione di fattori vasodilatatori come l'ossido nitrico (NO), e fattori vasocostrittori come l'endotelina;

- sintesi e secrezione di molecole anticoagulanti e antitrombotiche come prostaciclina, molecole analoghe all'eparina e attivatori del plasminogeno;
- sintesi e secrezione di molecole che promuovono la coagulazione del sangue come il fattore VIII (fattore di von Willebrand) e l'inibitore del fattore di attivazione del plasminogeno;
- produzione di mediatori dell'infiammazione come citochine, chemochine e molecole per l'adesione cellulare;
- produzione di fattori di crescita come FGF (fattore di crescita dei fibroblasti), PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) e GM-CSF (fattore di crescita dei granulociti e dei macrofagi).

Il sistema arterioso distribuisce il sangue dal cuore ai capillari in tutto l'organismo. L'azione ciclica del cuore determina nel sistema arterioso un flusso pulsante. Ad ogni contrazione dei ventricoli (sistole), il sangue viene spinto nel sistema arterioso e causa l'espansione delle pareti arteriose; il successivo ritorno elastico della parete arteriosa permette il mantenimento della pressione arteriosa nel periodo che intercorre tra due contrazioni successive (diastole). L'espansione ed il ritorno elastico sono facilitati dalla presenza di tessuto elastico nelle pareti del sistema arterioso. Il flusso di sangue verso i vari organi può essere regolato variando il diametro dei vasi. Questa funzione è svolta dalla componente muscolare liscia della parete vasale ed è, principalmente, sotto controllo del sistema nervoso simpatico e degli ormoni prodotti dalla midollare del surrene.

Sebbene le pareti delle arterie presentino una struttura generale comune, sono caratterizzate dalla presenza di quantità variabili di fibre elastiche e da uno strato di muscolatura liscia che è spesso in relazione al diametro del lume.

I tre tipi principali di vasi del sistema arterioso sono:

- **arterie elastiche** che comprendono i vasi di distribuzione come l'aorta, l'anonima, la carotide comune, la succlavia e la maggior parte dei vasi polmonari;
- **arterie muscolari** che sono le principali ramificazioni del sistema arterioso come le arterie femorali, le arterie cerebrali e le coronarie;
- **arteriole**, le ramificazioni terminali che alimentano i capillari.

La quantità di tessuto elastico diminuisce e la componente muscolare aumenta man mano che il vaso diventa più piccolo (Young Barbara, Heath John W., Wheater, Istologia e anatomia microscopica. 2001).

3. Patogenesi e decorso dell'Aterosclerosi

La patogenesi e il decorso della malattia aterosclerotica sono caratterizzati da diverse fasi (**Figura 1.2**). Il primo evento è il danno endoteliale: l'endotelio normalmente ha azione antitrombotica e regola il tono vasale e il diametro del lume attraverso la secrezione di vasocostrittori, vasodilatatori e inibenti l'azione piastrinica. Tale disfunzione endoteliale è dovuta non solo ai diversi fattori di rischio, ma anche alle forze meccaniche a cui è sottoposto l'endotelio, come lo shear stress (stress da attrito) e l'ipertensione, che svolgono un ruolo particolarmente importante.

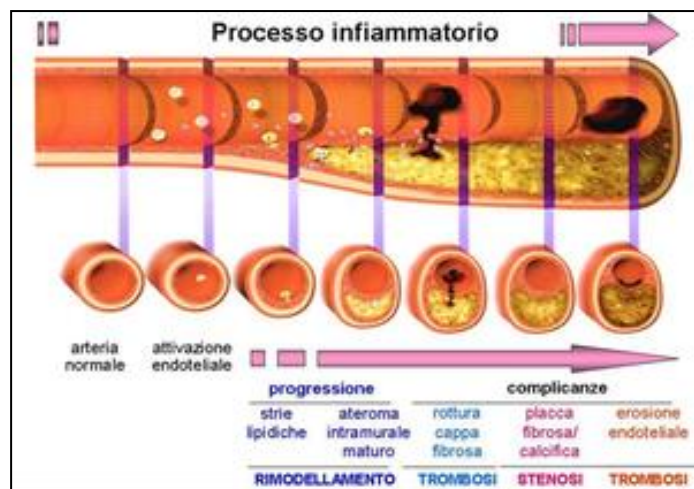


Figura 1.2 Fasi del processo aterosclerotico.

La principale sede di formazione delle placche aterosclerotiche è rappresentata dalle biforcazioni delle arterie dove il flusso sanguigno da laminare diventa turbolento, causando un maggiore attrito sulla parete che danneggia l'endotelio innescando il processo di formazione della placca. Tale lesione provoca un'alterazione funzionale dell'endotelio che aumenta la sua permeabilità favorendo l'accumulo di colesterolo, lipidi e cellule del sistema immunitario.

La prima lesione visibile nello sviluppo dell'aterosclerosi è la stria lipidica (fatty streak). Il colesterolo è un lipide appartenente alla famiglia degli steroli ed è uno dei principali componenti delle membrane plasmatiche animali. Introdotto con la dieta e prodotto a livello del fegato, poiché lipofilo, viene trasportato in circolo tramite proteine (le apolipoproteine) con le quali forma complessi lipoproteici, tra cui:

- Chilomicroni: trasportano colesterolo e trigliceridi introdotti con la dieta dall'intestino ai tessuti;

- VLDL (very low density lipoprotein): trasportano colesterolo e trigliceridi dal fegato ai tessuti;
- LDL (low density lipoprotein): trasportano trigliceridi ma sono ricche soprattutto di colesterolo (detto colesterolo cattivo) e trasportano dal fegato ai tessuti;
- HDL (high density lipoprotein): trasportano trigliceridi ma sono ricche soprattutto di colesterolo (detto colesterolo buono) e trasportano dai tessuti al fegato dove viene eliminato.

Un eccesso di colesterolo in circolo provoca l'accumulo di LDL a livello della parete dei vasi dove vengono ossidate (ox-LDL). L'apolipoproteina B (ApoB) rappresenta la componente proteica delle LDL ed è fondamentale per il loro metabolismo, assemblaggio e secrezione e funge, inoltre, da ligando dei recettori delle LDL situati sulle cellule di numerosi tessuti.

I monociti presenti nel torrente circolatorio migrano a livello della lesione, attraversano l'endotelio fino alla tonaca intima del vaso, differenziano in macrofagi ed iniziano a fagocitare le LDL ossidate; tali cellule sono dette cellule schiumose. L'accumulo di cellule schiumose ricche di lipidi a livello intracellulare forma la stria lipidica che causa un ispessimento della tonaca intima del vaso.

Le cellule schiumose rilasciano metalloproteasi, citochine, chemochine e fattori di crescita che richiamano altri componenti del sistema immunitario come i linfociti T dal torrente sanguigno e cellule muscolari lisce dalla tonaca media. L'ulteriore accumulo di lipidi e cellule causa un aumento di volume con formazione dell'ateroma.

Le cellule muscolari migrano e proliferano a livello dell'intima, dove successivamente assumono un fenotipo fibroblastoide e insieme ai fibroblasti residenti, producono componenti della matrice extracellulare formando una capsula fibrosa che circonda l'ateroma. Quando l'accrescimento è massimo si ha la formazione della placca aterosclerotica stabile.

Tale aumento di volume della placca causa la stenosi del vaso, cioè un restringimento del diametro del lume con conseguente diminuzione dell'apporto di sangue ai tessuti a valle. La placca cresce a discapito del lume dell'arteria causando un aumento della turbolenza del flusso sanguigno ed un conseguente aumento dello shear stress sulla parete del vaso; l'endotelio sottoposto ad uno stimolo aggiuntivo, prolifera ulteriormente ed incrementa l'accrescimento della placca aterosclerotica stessa.

Si definisce stenosi emodinamicamente efficiente quella che supera il 70% del lume del vaso

e causa una caduta del flusso a valle.

La stenosi parziale del vaso può aumentare fino all'occlusione. Questo avviene quando si ha la rottura della capsula fibrosa, che può avvenire per ulcerazione oppure a causa di un'emorragia interna della placca (**Figura 1.3**). Al suo interno, infatti, vi è neo-angiogenesi per permettere la sopravvivenza della componente cellulare; se vi è un aumento eccessivo del volume ed un'eccessiva vascolarizzazione, si può verificare un'emorragia interna della placca con conseguente rottura della capsula fibrosa.

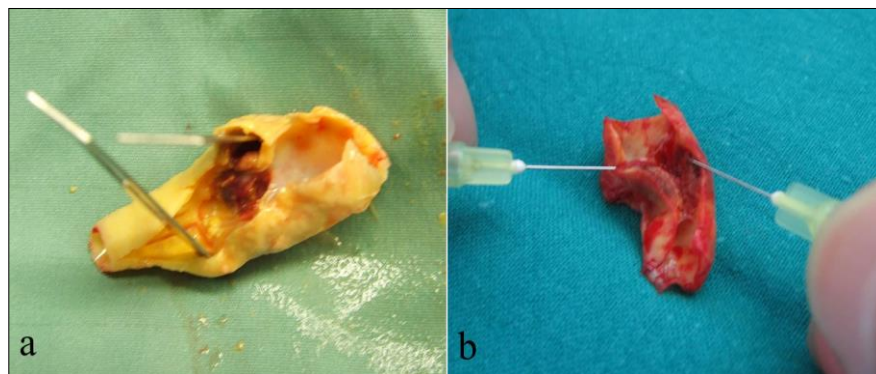


Figura 1.3 a) Placca ulcerata. b) Emorragia intraplacca.

L'evoluzione della placca in un fenotipo stabile o complicato dipende dal grado di rimodellamento della matrice extracellulare. I macrofagi ed i linfociti T che popolano la placca rilasciano diverse Metalloproteasi (MMP) che degradano la matrice destabilizzando la placca. Taurino e collaboratori (Taurino M. et al. 2008) hanno valutato il ruolo MMP-9 e MMP-2 e dell'inibitore tissutale delle MMP (TIMP)-2 in pazienti con stenosi carotidea e sottoposti a tromboendarteriectomia carotidea (TEA) (**Figura 1.4**). Da questo studio è emerso che la concentrazione plasmatica di MMP-9 era maggiore nei pazienti con stenosi rispetto a pazienti sani prima di essere sottoposti a TEA. In particolare, la concentrazione plasmatica di MMP-9 è risultata più elevata nei pazienti sintomatici e con danni cerebrali rispetto ai pazienti asintomatici. Un mese dopo l'intervento chirurgico la concentrazione plasmatica di MMP-9 è drasticamente diminuita nel 93,4% dei pazienti fino ad un valore inferiore rispetto alla concentrazione pre-operatoria. Per quanto riguarda la MMP-2, la sua concentrazione è risultata maggiore nei pazienti sottoposti a TEA rispetto ai pazienti sani, ma

è aumentata drasticamente un mese dopo l'intervento. I livelli di TIMP-2, invece, non hanno subito variazioni.

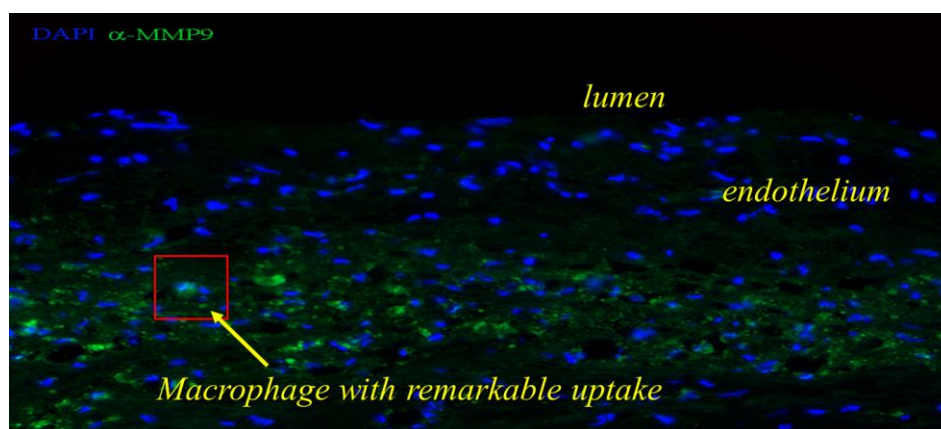


Figura 1.4 Immunofluorescenza della placca aterosclerotica carotidea. Sono marcati in blu i macrofagi ed in verde le metalloproteasi-9 (MMP9).

I dati ottenuti da tale studio suggeriscono che la MMP-9 possa essere direttamente coinvolta nel processo di rottura della placca aterosclerotica, ipotizzando, inoltre, un suo utilizzo come marker sierologico non invasivo per individuare pazienti ad alto rischio di eventi ischemici cerebrali.

La destabilizzazione alla formazione di una placca complicata: il suo contenuto viene riversato nel lume del vaso causando l'attivazione delle piastrine e dei processi di coagulazione con conseguente formazione di un trombo che può occludere completamente il vaso causando l'ischemia del tessuto a valle.

Tale risentimento clinico può non presentarsi se, contemporaneamente alla crescita della placca aterosclerotica, vi è stato lo sviluppo di circoli collaterali: la stenosi di un'arteria di conduzione induce una caduta di pressione nel letto vascolare post-stenotico dovuta alla differenza pressoria attraverso la stenosi ed alla vasodilatazione compensatoria delle arteriole post-stenotiche. La pressione negli adiacenti letti vascolari perfusi da arterie non stenotiche rimane invariata e, quindi, si sviluppa un gradiente pressorio lungo i piccoli vasi collaterali preesistenti che collegano i territori vascolari non colpiti e quelli post-stenotici. Questo gradiente di pressione aumenta il flusso attraverso i vasi collaterali stimolando l'arteriogenesi. Le cellule endoteliali, le cellule della muscolatura liscia e i monociti circolanti sono i

responsabili del processo di formazione delle nuove arterie; l'aumento dell'esposizione di molecole di adesione come ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) sulle cellule endoteliali che favorisce l'invasione delle cellule mononucleate circolanti nel tessuto perivascolare delle arterie collaterali, e la concomitante proliferazione delle cellule muscolari lisce e delle cellule dell'avventizia nella parete vasale rappresentano un passaggio essenziale per l'arteriogenesi (Hoefler et al. 2005).

Questo si manifesta se la crescita della placca avviene lentamente dando al circolo collaterale il tempo necessario per svilupparsi. Se l'occlusione, invece, è acuta come ad esempio a causa di un embolo, si avrà un risentimento clinico importante con conseguente ischemia del tessuto a valle che non riceverà più improvvisamente l'apporto di sangue necessario.

4. L'American Heart Association (AHA) classifica le lesioni aterosclerotiche

Le lesioni aterosclerotiche più precoci si possono trovare già nei bambini e nei lattanti mentre le placche più avanzate compaiono in genere all'inizio dell'età adulta. La stadiazione delle lesioni aterosclerotiche è stata inizialmente effettuata mediante l'osservazione macroscopica, utilizzando termini descrittivi come stria lipidica, placca ateromatosa, fibrosa o rotta. Poiché la terminologia variava da studio a studio, il confronto dei dati era impossibile.

Nel 1994-1995 il comitato scientifico dell'*American Heart Association* (AHA) ha diffuso la definizione di un sistema di stadiazione numerico attualmente utilizzato in maniera universale (Stary HC et al. 1994, Stary HC et al. 1995). Questa classificazione è basata sull'analisi istologica della placca nel punto di massima estensione. Le caratteristiche peculiari di ogni stadio sono riportate di seguito e sono rappresentate graficamente nella **Tabella 1.1** e nella **Figura 1.5**.

Le lesioni I, II e III sono lesioni iniziali, precursori silenti delle lesioni avanzate (IV, V e VI) da cui originano gli eventi clinici. Nelle prime tre decadi di vita la composizione delle lesioni è prevalentemente lipidica e lo stadio è normalmente tra I e III; dopo questo periodo l'evoluzione della placca diviene imprevedibile (stadio IV-VI). La formazione delle lesioni dell'intima dell'aorta e delle arterie coronarie tipicamente subisce un'accelerazione a 25-30 anni per gli uomini e a 40-45 anni per le donne.

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical correlation
Type I (initial) lesion isolated macrophage foam cells	<pre> graph TD I((I)) --> II((II)) II --> III((III)) III --> IV((IV)) IV --> V((V)) V --> VI((VI)) IV --> II V --> II </pre>	growth mainly by lipid accumulation	from first decade	clinically silent
Type II (fatty streak) lesion mainly intracellular lipid accumulation			from third decade	
Type III (intermediate) lesion Type II changes & small extracellular lipid pools				
Type IV (atheroma) lesion Type II changes & core of extracellular lipid		accelerated smooth muscle and collagen increase	from fourth decade	clinically silent or overt
Type V (fibroatheroma) lesion lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic				
Type VI (complicated) lesion surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus		thrombosis, hematoma		

Tabella 1.1 Classificazione delle lesioni aterosclerotiche.

Stadio I: le lesioni silenti appartenenti al tipo I presentano un ispessimento definito “adattivo” poiché è considerato la risposta fisiologica dell’arteria agli insulti del flusso ematico. Queste lesioni sono tipiche dei neonati e dei bambini e sono presenti negli adulti nelle porzioni delle arterie meno suscettibili alle lesioni. Sono costituite da depositi lipidici rilevabili solo al microscopio elettronico.

Stadio II: le lesioni di II° tipo sono tipiche della pubertà e sono correlate alle concentrazioni plasmatiche di colesterolo. Sono costituite da macrofagi con inclusioni lipidiche (cellule schiumose) e linfociti T, disposti in strie di colore giallo grossolanamente individuabili sulla superficie dell’intima.

Stadio III: le lesioni di III° tipo, dette lesioni intermedie, transizionali o preateromi, sono tipiche degli adulti di giovane età. Oltre alle cellule schiumose, sono presenti accumuli lipidici extracellulari.

Stadio IV: le lesioni avanzate di IV° tipo presentano un ulteriore deposizione e confluenza dei lipidi extracellulari con formazione di un “core lipidico” (ateroma).

Stadio V: le lesioni di V° tipo sono caratterizzate dalla formazione di tessuto fibroso e sono

distinguibili in tre sottoclassi:

- **Va** costituite da fibroateroma con prevalenza di core lipidico;
- **Vb** (anche indicato come stadio VII) formate da fibroateroma con calcificazioni;
- **Vc** (anche indicato come stadio VIII) prevalentemente fibrose con core lipidico quasi assente.

Stadio VI: le lesioni di VI° tipo sono definite complicate, in quanto sono quelle che più facilmente generano manifestazioni cliniche croniche o acute. Sono frequenti nella quarta decade di vita e si distinguono nei seguenti sottotipi:

- **VIa** caratterizzate da ulcerazioni della superficie endoteliale;
- **VIb** con presenza di ematoma o emorragia nei vasi interni alla lesione;
- **VIc** con trombi;
- **VIabc** con presenza di tutte le alterazioni suddette.

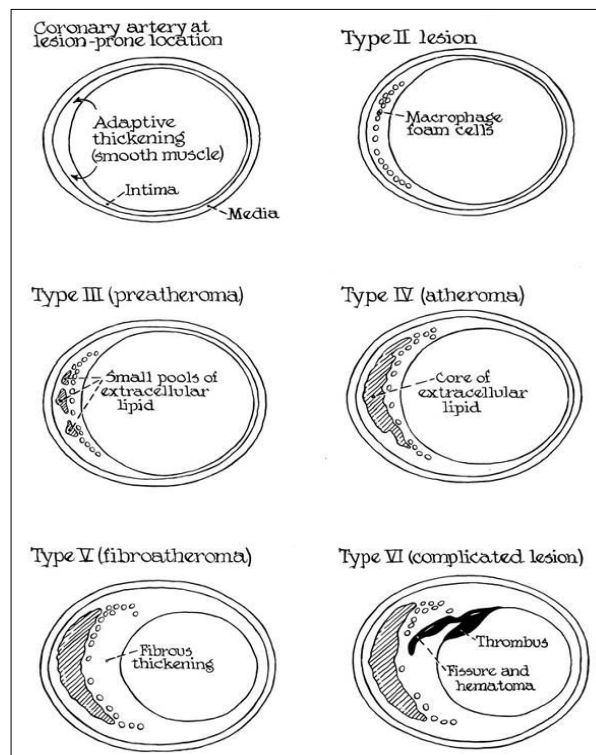


Figura 1.5 Classificazione delle lesioni aterosclerotiche basata sull'analisi istologica della placca nel punto di massima estensione secondo il comitato scientifico dell'American Heart Association (AHA).

5. La fisiopatologia dell'Aterosclerosi e le sue manifestazioni cliniche

Le principali manifestazioni cliniche associate alla presenza di placche aterosclerotiche sono l'insufficienza cerebrovascolare, l'infarto del miocardio e le arteriopatie obliteranti croniche degli arti inferiori.

Per insufficienza cerebrovascolare si intende un insufficiente apporto di ossigeno ai tessuti cerebrali che possono andare in sofferenza. È una delle principali cause di morte e la principale causa di disabilità adulta nei paesi sviluppati. Circa l'85% degli ictus cerebrali sono di natura ischemica e sono dovuti all'occlusione di un'arteria cerebrale o alla formazione di un trombo in seguito ad ulcerazione di una placca aterosclerotica a livello dell'arteria carotidea; oppure possono essere inoltre causati da un embolo che parte dal cuore e da vasi sia extra che intra-cranici e che procedendo verso la periferia dell'albero arterioso può occludere le arterie terminali del cervello.

Il Poligono di Willis è un circolo anastomotico di arterie posizionato alla base del cranio.

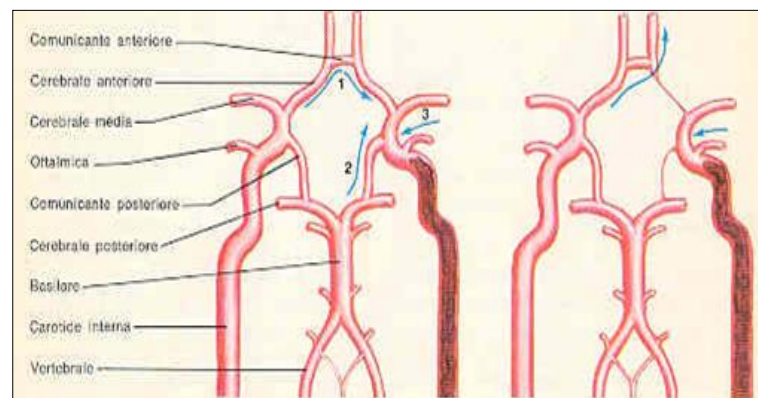


Figura 1.6 Poligono di Willis correttamente sviluppato a sinistra e non correttamente sviluppato a destra.

I vasi afferenti al Poligono sono i vasi epiaortici che nascono dall'arco aortico. Dall'arco aortico originano: da destra il tronco anonimo (o arteria anonima o tronco brachiocefalico) che subito si divide in due grandi vasi, l'arteria succlavia di destra e la carotide comune di destra; da sinistra originano invece separatamente l'arteria succlavia di sinistra e la carotide comune di sinistra. Dall'arteria succlavia di destra e di sinistra originano le due arterie vertebrali mentre dalla carotide comune di destra e di sinistra originano le due carotidi interne.

Queste arterie si riuniscono formando il Poligono di Willis. Le arterie efferenti del Poligono invece sono le due arterie cerebrali anteriori, due arterie cerebrali medie e due arterie cerebrali posteriori. Tra le due arterie cerebrali anteriori è presente l'arteria comunicante anteriore mentre tra le arterie cerebrali anteriore e posteriore di destra e di sinistra è presente rispettivamente l'arteria comunicante posteriore di destra e di sinistra. Queste arterie sono organizzate a formare un ettagono che si occupa di distribuire in modo costante ed uniforme il sangue al cervello che necessita di 50ml per 100g di sangue al minuto. Se vi giunge una quantità di sangue inferiore, il tessuto cerebrale va in sofferenza e si sviluppa un ictus.

Solo il 50% delle persone risulta avere un Poligono di Willis correttamente sviluppato mentre il restante 50% manca di alcune arterie comunicanti (**Figura 1.6**).

In presenza di un'ostruzione della carotide interna di destra a causa della formazione di un trombo a livello di una placca aterosclerotica posizionata sulla biforcazione carotidea, in un soggetto con il Poligono di Willis correttamente sviluppato non si avrà nessun risentimento clinico e nessun disturbo emodinamico in quanto il sangue giungerà comunque al cervello attraverso la carotide interna di sinistra e ridistribuito nel Poligono; in un soggetto, invece, con un Poligono di Willis non correttamente sviluppato questo meccanismo compensatorio viene a mancare con conseguente ischemia cerebrale.

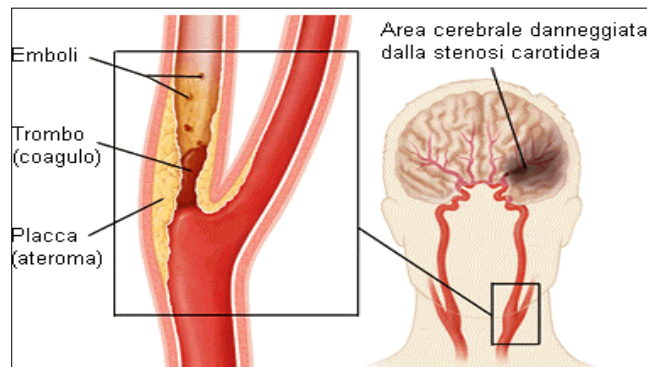


Figura 1.7 Meccanismo trombo-embolico: ischemia cerebrale dovuta al distacco di un embolo dalla placca aterosclerotica carotidea ed alla sua migrazione fino ad un'arteria terminale del cervello.

Anche un soggetto con il Poligono di Willis correttamente sviluppato può andare, però, subire ischemia attraverso un meccanismo trombo-embolico: una piccola parte dell'ateroma può

staccarsi, attraversare tutto il Poligono di Willis ed andare ad occludere un'arteria terminale del cervello (*Figura 1.7*).

Un risentimento clinico molto importante dovuto ad un meccanismo trombo-embolico è l'attacco ischemico transitorio (TIA): un coagulo fresco di piccole o piccolissime dimensioni che si forma a livello della placca aterosclerotica carotidea può migrare ed andare a depositarsi nelle arterie cerebrali causando un'ischemia temporanea della parte del cervello irrorata da tale arteria che si manifesta con un deficit delle funzioni controllate dell'area interessata. Il coagulo fresco, tuttavia, poiché si deposita sull'endotelio intatto e funzionante, grazie alla attività anti-trombotica ed anti-coagulante di quest'ultimo, verrà sciolto per trombolisi spontanea con conseguente scomparsa della manifestazione clinica.

La conseguenza principale dell'ischemia è la morte delle cellule cerebrali. Questa viene innescata da un aumento di calcio a livello citoplasmatico con conseguente danno ossidativo ed alterazione funzionale dei mitocondri; ciò attiva diversi pathway di morte cellulare. In tale condizione i mitocondri vanno incontro a rigonfiamento ed a perdita dell'integrità della loro membrana con conseguente morte cellulare per necrosi (Gibson CL. et al. 2013). In un recente lavoro è stato dimostrato che le vie di morte cellulare attivate in cervelli ischemici di maschi e femmine sono diverse: nelle femmine viene attivata la via apoptotica caspasi-dipendente mentre nei maschi viene attivata quella caspasi-indipendente. In questo studio è stata indotta un'occlusione reversibile di un'arteria cerebrale (MCAO) a topi sia di sesso maschile che femminile; in seguito è stato somministrato un inibitore delle caspasi e dopo 48 ore sono stati analizzati i livelli della caspasi-8, del citocromo-c (coinvolti nella via apoptotica caspasi-dipendente) e di AIF (apoptosis-inducing factor, coinvolto nella via apoptotica caspasi-indipendente). In entrambi è stato evidenziato un aumento della caspasi-8 e del citocromo c subito dopo l'induzione del MCAO e la loro diminuzione nelle femmine in seguito alla somministrazione dell'inibitore delle caspasi; il fattore AIF, invece, in entrambi non risulta alterato. Ciò dimostra che l'inibizione delle caspasi ha un effetto neuroprotettivo solo nelle femmine (Liu F. et al. 2009). Nei maschi, invece, l'aumento di NO porta all'attivazione della polimerasi PARP-1 (poly ADP-ribose polymerase) attivata per riparare il DNA danneggiato, ed al rilascio di AIF dal mitocondrio danneggiato, che trasloca nel nucleo dove attiva il pathway di morte cellulare caspasi-indipendente (Yu SW et al. 2002).

L'Infarto del miocardio causa circa il 33% del totale delle morti per malattie del sistema cardiocircolatorio (www.salute.gov). Nella maggior parte dei casi è dovuto all'ostruzione di

una arteria coronaria a causa della formazione di un trombo a livello di una placca aterosclerotica. L'insufficiente afflusso di sangue al cuore riduce drasticamente l'apporto di ossigeno alle cellule del miocardio; queste vanno così incontro a morte per necrosi e vengono rimpiazzate da tessuto cicatriziale non contrattile. La stenosi parziale delle coronarie, invece, causa l'Angina Pectoris, una sintomatologia caratterizzata da un forte dolore al torace dovuto all'accumulo intracellulare di metaboliti tossici determinato da una diminuzione dell'apporto di ossigeno al miocardio causata dal ridotto afflusso di sangue. Può essere il segno di un imminente attacco cardiaco e non deve essere sottovalutata. La proteina C reattiva (PCR) è considerata come il principale fattore predittivo di Infarto del miocardio poiché la sua concentrazione ematica aumenta drasticamente prima dell'infarto e nei pazienti con Angina Pectoris. Tuttavia, recentemente è stato dimostrato che pazienti con sindrome coronarica conclamata sottoposti ad angiografia coronarica con una concentrazione di PCR superiore al valore soglia di normalità subivano un evento cardiovascolare entro un anno dall'esame, nonostante ciò non è stata trovata una correlazione diretta tra i livelli di PCR e l'entità della stenosi e la rottura della capsula fibrosa della placca aterosclerotica (Cheng JM et al. 2014).

Le arteriopatie obliteranti croniche degli arti inferiori, invece, rappresentano un insieme di condizioni morbose caratterizzate da lesioni ostruttive localizzate nei distretti arteriosi a valle delle arterie renali le quali comportano, indipendentemente dalla loro natura, la riduzione della perfusione agli arti inferiori. Tale arteriopatìa può manifestarsi clinicamente sia durante l'attività fisica che nella condizione di riposo e può essere asintomatica oppure può provocare dolore intermittente (claudicatio intermittens); l'intensità del dolore è direttamente correlata al grado di ostruzione dell'arteria interessata e allo sviluppo dei circoli collaterali. Nella condizione più grave i pazienti sono colpiti da ischemia critica dell'arto che può andare in cancrena.

6. La dissecazione acuta dell'aorta ascendente come una delle conseguenze della patologia aterosclerotica

La dissecazione acuta dell'aorta (AAD) è una malattia che potenzialmente può portare alla morte con un'incidenza di circa 2,6 - 3,6 casi per 100.000 all'anno (Isselbacher EM et al. Circulation 2005). La classica dissecazione aortica inizia da una lacerazione della tunica intima con conseguente propagazione fino allo strato mediale dell'aorta. Questo causa la

formazione di un falso lume all'interno della tunica media e quindi all'attraversamento del sangue all'interno della parete dell'arteria.

Le principali cause della dissecazione aortica sono la rottura dei vasa vasorum (Heistad DD et al. 1994) o la presenza di un'emorragia all'interno di una placca aterosclerotica che si indebolisce e può rompersi e, a volte, può risultare nella dissecazione aortica. Possibili altri fattori che portano alla rottura dell'aorta sono anche i traumi, alcuni tipi di vasculiti e le infezioni (Tsai TT et al. 2005). Nel Registro Internazionale della Dissecazione Acuta dell'Aorta il principale fattore che predispone all'insorgenza della patologia è l'Ipertensione Arteriosa (72%) seguita dall'Aterosclerosi (31%), precedenti interventi chirurgici cardiaci (18%), la Sindrome di Marfan (5%) e cause iatrogene (4%) (Hagan PG et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection- IRAD-: new insights into an old disease. JAMA. 2000;283:897-903).

I principali sistemi di classificazione della sindrome aortica acuta sono il Sistema di DeBakey e il Sistema di Stanford.

Il sistema DeBakey (DeBakey ME et al. J Thorac Cardiovasc Surg 1965) classifica la dissecazione in base a dove si trova la lacerazione intimale originale e in base all'estensione della dissecazione:

- Tipo I - nasce nell'aorta ascendente e si estende coinvolgendo l'aorta ascendente, l'arco aortico e l'aorta toracica. È la forma più letale e colpisce principalmente pazienti con età inferiore ai 65 anni.
- Tipo II - origina ed è confinata nell'aorta ascendente
- Tipo III - coinvolge l'aorta discendente distalmente all'origine dell'arteria succlavia. Si presenta più spesso in pazienti anziani affetti da aterosclerosi e ipertensione arteriosa
- Tipo IIIa - limitato all'aorta discendente toracica
- Tipo IIIb - coinvolge l'aorta toracica e addominale

Il sistema di Stanford (Tsai TT et al. 2005) classifica la dissecazione in base al sito di rottura della parete arteriosa. L'AAD può essere di tipo A di Stanford quando è coinvolto il tratto ascendente dell'aorta toracica e/o l'arco aortico, e di tipo B di Stanford quando è coinvolto il tratto discendente dell'aorta toracica e/o il tratto aortico addominale. (**Tabella 1.2**).

Classification according to location:	
Ascending aorta	Stanford Type A, De Bakey Type II
Ascending and descending aorta	Stanford Type A, De Bakey Type I
Descending aorta	Stanford Type B, De Bakey Type III

Classification of Aortic Disease:	
Class I	Classic aortic dissection
Class II	Intramural hematoma
Class III	Localized dissection, intimal tear without intimal flap formation
Class IV	Penetrating aortic ulcers
Class V	Iatrogenic or post-traumatic dissection

Tabella 1.2 Sistemi di classificazione della sindrome aortica acuta: il Sistema di DeBakey e il Sistema di Stanford

7. I meccanismi molecolari che caratterizzano il processo di dissecazione acuta dell'aorta ascendente

La principale modificazione istologica descritta nelle patologie aortiche è l'appiattimento e l'indebolimento della parete arteriosa a livello della tonaca media caratterizzata dalla degenerazione della matrice extracellulare, dalla deplezione delle cellule della muscolatura liscia, dalla frammentazione delle fibre elastiche e dalla degradazione delle fibre collagene (Didangelos A et al. 2011). Inoltre, uno squilibrio tra le metalloproteasi (MMPs), gli enzimi degradativi della matrice extracellulare, e dei loro inibitori (TIMPs) favorisce la progressione del processo di degradazione aortica. È stato evidenziato che vi è un meccanismo immuno-

infiammatorio alla base della AAD di tipo A di Stanford che contribuisce al rimodellamento della parete arteriosa in soggetti geneticamente predisposti (Del Porto F et al. 2014; Luo F et al. 2009). Questo suggerisce che l'infiammazione e la degradazione della matrice extracellulare rappresentano degli steps fondamentali nel complesso processo della AAD.

Poiché la presenza di placche aterosclerotiche predispone alla rottura della parete arteriosa che caratterizza la dissecazione aortica, il complesso processo infiammatorio alla base dell'aterosclerosi potrebbe contribuire al manifestarsi della patologia. Infatti, nelle sezioni istologiche di aorta dissecata è stato riscontrato un massiccio infiltrato infiammatorio composto da macrofagi, linfociti T e linfociti B attivati (Luo F et al. 2009). In precedenti studi svolti nel mio laboratorio è stato descritto, attraverso tecniche di biologia molecolare e immunohistochimica, che i macrofagi rappresentano la principale popolazione cellulare presente nella tunica media di aorta dissecata di pazienti con Stanford-A AAD che non presentano una predisposizione genetica, mentre le sottopopolazioni di linfociti T CD4+ sono risultate essere significativamente inferiori, sia in campioni istologici di aorta che nel sangue periferico. Inoltre, hanno anche dimostrato che i livelli sierici delle citochine rilasciate dai linfociti T helper 1 sono significativamente inferiori rispetto a quelle prodotte dai macrofagi (Del Porto F et al. 2010). Anche in topi ApoE KO infusi con AngiotensinaII è stato osservato un accumulo di macrofagi nella tonaca media durante le fasi iniziali della lesione della parete arteriosa che sono risultati essere i responsabili della degradazione dell'elastina e della conseguente dissecazione della parete arteriosa. In particolare, è stato osservato che la dissecazione precede la formazione dell'aneurisma, mentre la formazione della placca aterosclerotica avviene successivamente ed è accompagnata da un progressivo aumento dell'infiltrazione di linfociti T nella parete dell'arteria (Saraff K. et al. 2003).

Tuttavia, il fatto che la dissecazione acuta dell'aorta avviene anche in pazienti che presentano lesioni atero-occlusive evidenti suggerisce che la placca aterosclerotica, la dissecazione della parete arteriosa e l'aneurisma rappresentano le differenti sfaccettature di una stessa complessa patologia. Probabilmente fattori genetici, infiammatori, immunologici ed ambientali contribuiscono in diversi modi all'insorgenza ed alla progressione del danno vascolare in differenti siti dell'arteria aortica.

Capitolo II

L'Aterosclerosi e il ruolo del Sistema Immunitario

1. Il processo infiammatorio e le sue fasi

Il processo infiammatorio è una risposta difensiva del nostro organismo ad agenti esterni come agenti fisici, chimici, tossici e di natura biologica (soprattutto virus e batteri). L'infiammazione (o flogosi) è una reazione locale al danno cellulare di tessuti vascolarizzati. Si ha una reazione cellulare che prevede il reclutamento dei leucociti a livello della zona lesa, la loro migrazione attraverso il vaso e la riparazione del tessuto danneggiato.

Di solito il vaso presenta la componente cellulare del sangue al centro e il plasma in periferia; nell'infiammazione vi è vasodilatazione e rallentamento del flusso sanguigno con il plasma che si dispone al centro e la componente cellulare in periferia. A questo punto, i leucociti si muovono all'interno del vaso per "rolling" sull'endotelio grazie all'interazione tra le integrine esposte sulla loro superficie e le selectine dell'endotelio, molecole proteiche che mediano l'adesione dei leucociti all'endotelio. Nella fase successiva si ha il processo di diapedesi cioè la fuoriuscita dei leucociti, attraverso gli spazi interstiziali dell'endotelio, dal compartimento ematico a quello extravasale (**Figura 2.1**).

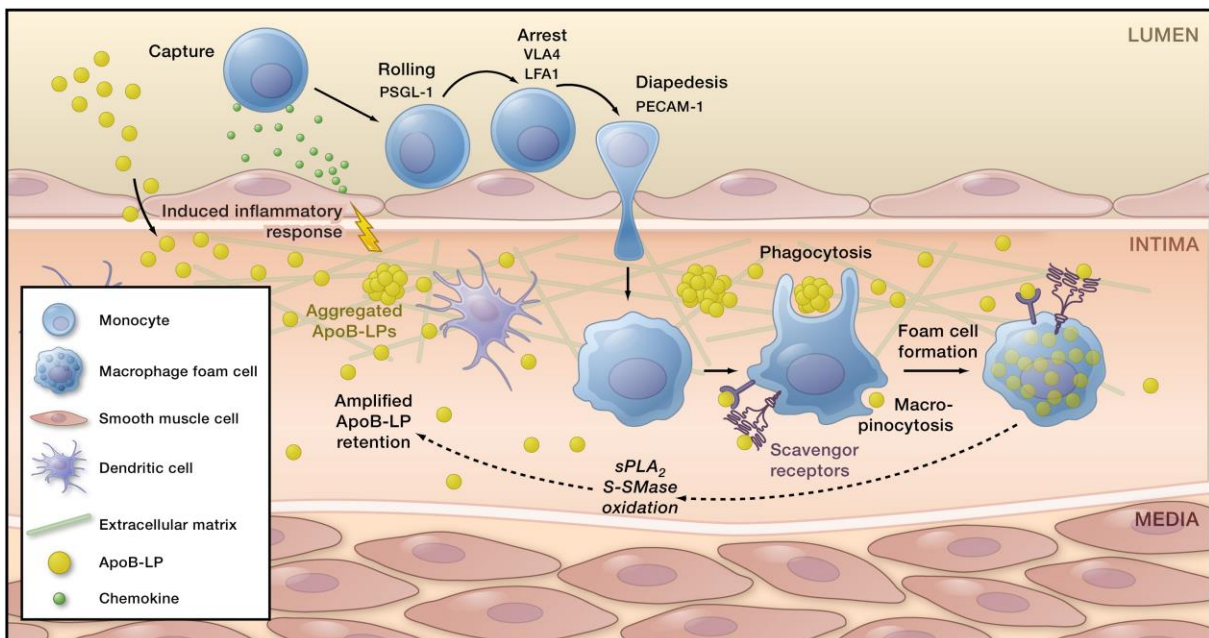


Figura 2.1 Processo di rotolamento e diapedesi dei leucociti nel sito dell'infiammazione.

Si ha ora la fase di riparazione del danno: il fluido in eccesso viene rimosso attraverso i vasi linfatici, i macrofagi fagocitano il tessuto danneggiato e rilasciano fattori di crescita che richiamano i fibroblasti; questi ultimi proliferano, si differenziano e sintetizzano nuova matrice extracellulare per riparare il danno.

I componenti principali del SI sono i monociti macrofagi ed i linfociti. I monociti circolanti nel torrente sanguigno migrano a livello tissutale dove differenziano in macrofagi; i macrofagi appartengono alla classe dei fagociti e la loro funzione principale nell'infiammazione è quella di fagocitare nel loro citoplasma particelle estranee all'organismo e di distruggerle. Secernono inoltre citochine pro-infiammatorie e presentano l'antigene ai linfociti T-CD4+.

I linfociti T sono responsabili della risposta adattativa cellulo-mediata: riconoscono l'antigene quando questo viene esposto dalle APC (cellule presentanti l'antigene) attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC di classe 1 o 2). L'interazione specifica tra il proprio recettore e l'antigene ne induce la proliferazione e la maturazione in linfociti T-CD8+ o T-CD4+. I linfociti T-CD8+ maturano in linfociti T citotossici che svolgono, cioè, attività citotossica nei confronti dell'agente patogeno; i linfociti T-CD4+ maturano in linfociti T-helper che stimolano la proliferazione ed il reclutamento di altri componenti del sistema immunitario.

Un'eccessiva risposta infiammatoria può causare però gravi danni all'organismo. I vari componenti del sistema immunitario rilasciano diversi tipi di citochine, principali mediatori del processo infiammatorio e responsabili del mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario.

Le citochine possono essere suddivise in due classi: le citochine pro-infiammatorie e quelle anti-infiammatorie.

Le citochine pro-infiammatorie contribuiscono ad innescare ed amplificare la risposta infiammatoria allo scopo di contrastare l'insulto.

Le principali citochine pro-infiammatorie sono:

- TNF- α (Fattore di Necrosi Tumorale- α) e IL-1 (Interleuchina-1), le prime citochine prodotte dalla maggior parte dei componenti del Sistema Immunitario che stimolano il reclutamento nel tessuto leso dei leucociti e inducono la produzione di molecole di adesione (integrine), chemochine e fattori di crescita;
- IL-6 e IFN- γ (Interferone- γ) che attivano i macrofagi;
- IL-5 che attiva gli eosinofili;

- IL-2 importante per la crescita dei linfociti T;
- IL-12 e IL-4 che stimolano il differenziamento dei linfociti T rispettivamente in linfociti Th1 e linfociti Th2;
- IL-17 che richiama i neutrofili nel luogo dell'infiammazione;
- chemochine che stimolano i movimenti leucocitari.

Le principali citochine anti-infiammatorie, IL-10 e TGF- β (Fattore di Crescita Trasformante- β), limitano la reazione infiammatoria in quanto inibiscono l'attività fagocitaria e battericida di macrofagi e neutrofili ristabilendo l'omeostasi del sistema in seguito alla riparazione del danno tissutale (Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Immunologia cellulare e molecolare).

2. L'immunopatologia cellulare e molecolare dell'Aterosclerosi

La placca aterosclerotica è caratterizzata dall'accumulo di lipidi nella parete delle arterie e dall'infiltrazione di cellule del sistema immunitario come i macrofagi ed i linfociti e dalla formazione da parte delle cellule della muscolatura liscia di un cappuccio fibroso composto principalmente da collagene.

I lipidi hanno un ruolo centrale nella patogenesi della placca in particolare, un'elevata concentrazione di colesterolo circolante promuove la patologia aterosclerotica. Il colesterolo viene trasportato nel sangue dalle LDL che si accumulano a livello della tonaca intima attraverso interazioni ioniche tra l'apolipoproteina B100 delle LDL e i proteoglicani della matrice extracellulare (Tabas I et al. 2007). Le LDL intrappolate a livello subendoteliale sono soggette a modificazioni ossidative da parte di enzimi come mieloperossidasi e lipossigenasi e da specie reattive dell'ossigeno (ROS) generati nell'intima durante le fasi iniziali di infiammazione aterosclerotica. Le LDL ossidate (oxLDL) causano l'esposizione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali e la produzione di chemochine che guidano l'infiltrazione delle cellule immuni nell'intima. Il meccanismo che media questa risposta non è stato ancora ben identificato ma sembra sia coinvolto il pathway Jak-STAT (Jak chinasi e STAT fattore trascrizionale) (Gharavi, N.M. et al. 2007), e il pathway di EGR-1 (Bochkov, V.N. et al. 2002).

In particolare, le principali popolazioni cellulari coinvolte nel processo aterosclerotico sono i monociti macrofagi, le cellule dendritiche, i linfociti B e i linfociti T (***Figura 2.2***).

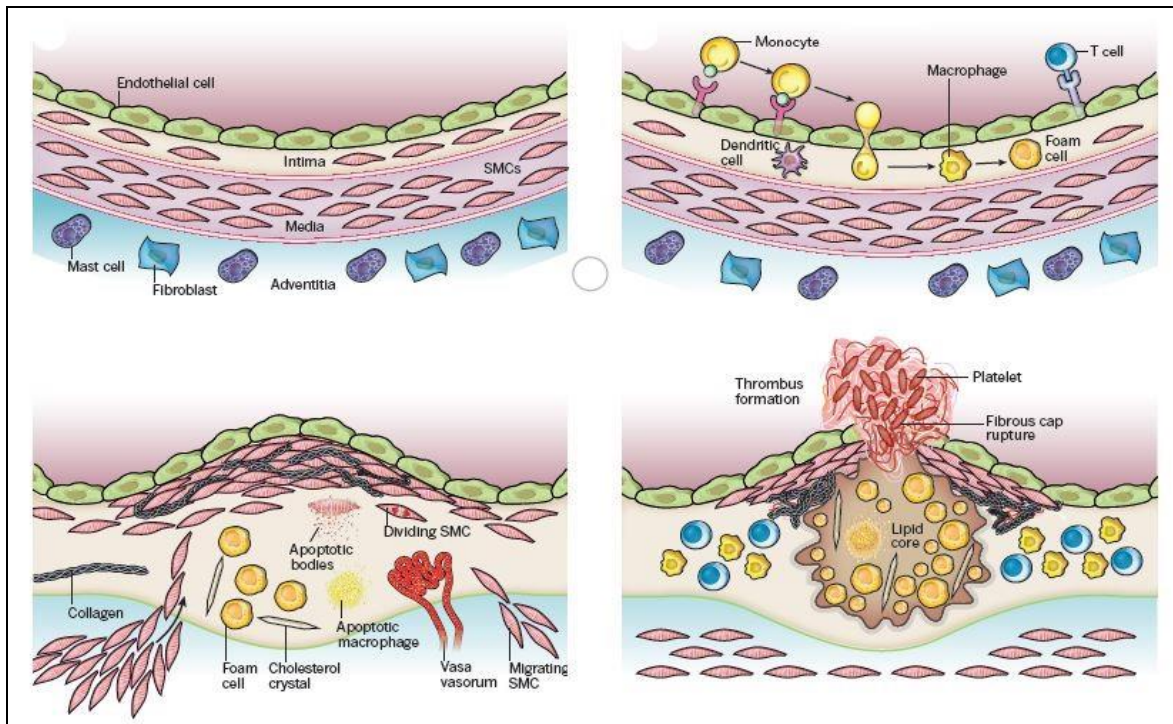


Figura 2.2 Infiltrato di cellule del Sistema Immunitario nella placca durante le fasi del processo aterosclerotico. (Libby et al. Nature 2011)

Le lesioni precoci sono caratterizzate da un ricco infiltrato di cellule T e macrofagi-cellule schiumose caricate di lipidi. In seguito, l'accumulo di cellule necrotiche, detriti e cristalli di colesterolo formano un core necrotico. Le placche fibroateromatose sono ricoperte da un cappuccio fibroso composto da collagene e cellule muscolari lisce che sono progressivamente rimpiazzate da macrofagi nelle placche infiammate prossime alla rottura.

Lo step finale della patologia, che porta alla destabilizzazione e rottura della placca, è indotto dal rilascio a livello della capsula fibrosa di metalloproteasi ed elastasi da parte dei leucociti accumulati. Il reclutamento di specifiche popolazioni cellulari e la progressione della lesione aterosclerotica verso una placca stabile o instabile, sono strettamente correlate ad uno squilibrio tra fattori pro-aterogeni ed anti-aterogeni (Businaro et al. 2013, Weber C and Noel H. 2011).

In condizioni fisiologiche, in caso di danno tissutale le stesse cellule dell'immunità rilasciano fattori che inibiscono il processo infiammatorio per permettere la riparazione del tessuto danneggiato e la risoluzione del processo infiammatorio stesso.

Nel caso dell'aterosclerosi l'equilibrio tra queste due fondamentali fasi di infiammazione e di riparazione del danno tissutale viene meno e ciò porta alla progressione della lesione

aterosclerotica fino all'occlusione dell'arteria interessata (**Figura 2.3**)

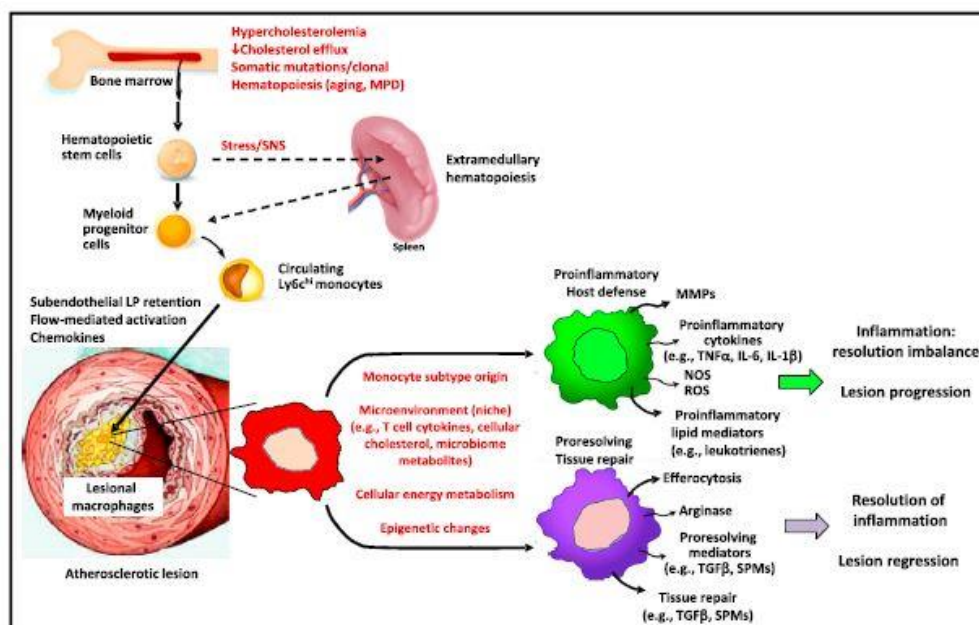


Figura 2.3 La non risoluzione del processo infiammatorio non permette la riparazione del danno tissutale e porta alla progressione della lesione aterosclerotica. (Tabas I. et al Immunity. 2017 Oct 17;47(4):621-634)

Recentemente sono stati pubblicati vari studi che attribuiscono un ruolo fondamentale al sistema immunitario nelle patologie cardiovascolari.

2.1 La risposta immunitaria innata e l'innescò del processo aterosclerotico

La prima forma di difesa immunitaria delle arterie è di tipo innato ed è orchestrata dalle cellule endoteliali; in seguito a stimoli infiammatori, la prima popolazione cellulare che viene richiamata è rappresentata dai monociti che a loro volta reclutano altri componenti del sistema immunitario a livello della parete delle arterie. La risposta immunitaria innata è coinvolta principalmente nelle fasi iniziali del processo aterosclerotico (Lundberg, A.M et al. 2010).

La prima fase dello sviluppo della patologia aterosclerotica è caratterizzata da una serie di alterazioni fenotipiche a livello delle cellule endoteliali ed alla conseguente perdita del controllo dell'omeostasi nei vasi sanguigni. In risposta a vari stimoli nocivi, le cellule endoteliali vanno incontro all'aumento dell'espressione di molecole di adesione ed alla sintesi di fattori pro-infiammatori e pro-trombotici (Weber et al. 2007). Di conseguenza, le oxLDL si

accumulano nell'intima della parete arteriosa dove danno inizio al processo infiammatorio stimolando non solo l'espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali, ma anche il rilascio di citochine e chemochine da parte delle cellule dell'infiltrato infiammatorio.

Le cellule endoteliali attivate espongono sulla loro superficie molecole di adesione come ICAM-1, VCAM, e le selectine P ed E i cui ligandi sono espressi da monociti e linfociti, favorendo la loro infiltrazione nell'intima della parete vasale. Infatti, è stato dimostrato che in topi ApoE KO e mancanti della P selectina, di ICAM-1 o della E selectina sono protetti dalla formazione di placche aterosclerotiche (Collins RG et al. 2000).

Inoltre, è stato proposto che la progressione della malattia aterosclerotica possa risultare dalla perdita della tolleranza immunitaria verso antigeni presenti nella placca. Businaro e collaboratori hanno dimostrato che HSP-90 è espressa in elevate quantità nel siero e nelle placche di pazienti affetti da aterosclerosi e rappresenta un potenziale autoantigene capace di indurre una risposta autoimmune implicata nella patogenesi dell'aterosclerosi carotidea (Businaro et al. 2009).

L'immunizzazione contro antigeni presenti nella placca aterosclerotica potrebbe, quindi, rappresentare un valido approccio terapeutico per l'aterosclerosi. Ad esempio, l'immunizzazione con autoantigeni come le HSPs, ApoB e le oxLDL potrebbe potenziare l'immunità mediata dai linfociti T regolatori e potrebbe rappresentare un nuovo tipo di vaccino immunoterapico ad uso umano.

In tale contesto, le cellule dendritiche potrebbero rappresentare un approccio utile per conferire la tolleranza ad autoantigeni. Le cellule dendritiche (DC) sono cellule professionali presentanti l'antigene (APC), specializzate nella cattura e nel processamento di antigeni in frammenti peptidici che sono successivamente complessati con le molecole MHC e presentati alle cellule T per dare inizio alla risposta immunitaria. In uno studio condotto su un modello murino, sono state utilizzate cellule dendritiche prelevate dal midollo osseo di topi esponenti ApoB100 umana sugli MHC, con lo scopo di valutare il loro potenziale nell'inibire la progressione della patologia aterosclerotica (**Figura 2.4**). I risultati di questo studio hanno dimostrato che tali DC hanno indotto una diminuzione della presenza di linfociti Th1 e Th2 diretti contro ApoB100 ed un aumento della presenza di linfociti T regolatori (Hermansson A. et al. 2011), supportando così la validità dell'immunizzazione contro autoantigeni.

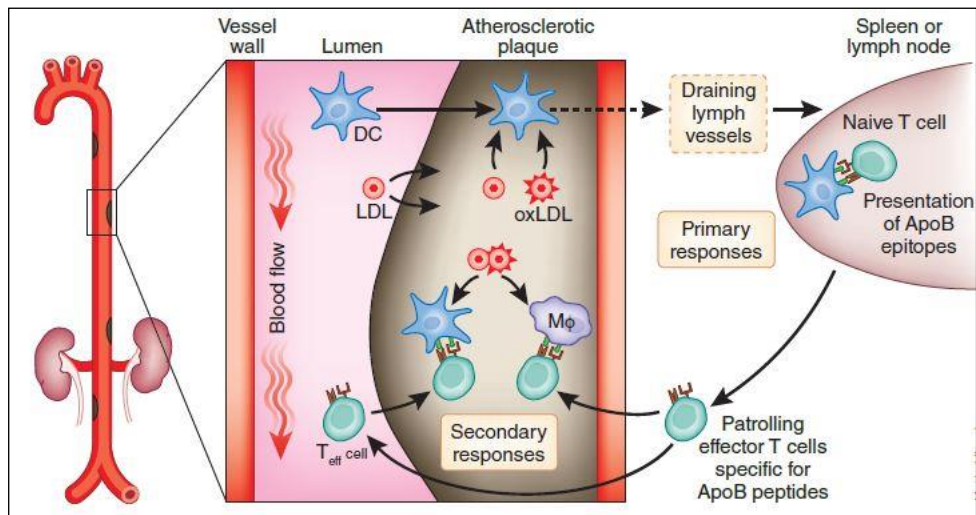


Figura 2.4 Presentazione di ApoB umana da parte delle DCs ai linfociti T naive per indurre la tolleranza immunologica (Hansson GK, Hermansson A. Nat Immunol 2011).

Tuttavia, l'aterosclerosi probabilmente non è una patologia autoimmune in senso stretto ma è dovuta ad una disfunzione immunitaria locale.

I monociti reclutati nella tonaca intima differenziano in macrofagi che successivamente danno vita alle cellule schiumose nella placca aterosclerotica. I principali fattori rilasciati soprattutto dalle cellule endoteliali attivate coinvolti nel reclutamento dei monociti dal torrente circolatorio sono le chemochine fractalchina (CX3CL1) e la proteina-1 chemoattraente dei monociti (MCP-1 o CCL2) ed i loro recettori, rispettivamente CX3CR1 e CCR2, espressi sulla superficie dei monociti circolanti.

I monociti esprimono tutti sulla loro superficie il CD14 che funge da corecettore del Toll-like Receptor-4 (TLR-4) e possono essere suddivisi in tre gruppi in base al loro fenotipo ed alla loro funzione:

- i monociti “classici” $CD14^{++} CD16^{-}$ (la cui controparte murina sono i monociti $Ly6C^{hi} CX3CR1^{lo} CCR2^{hi}$) rappresentano circa l'85% dei monociti totali ed esprimono sulla loro superficie in elevata concentrazione il CCR2, $Fc\gamma RI$, L-selectina, il recettore scavenger di classe A (ScR-A) ed il VEGFR-1;
- i monociti “non classici” $CD14^{+} CD16^{++}$ (la cui controparte murina sono i monociti $Ly6C^{lo} CX3CR1^{hi} CCR2^{lo}$) rappresentano circa il 10% dei monociti totali, sono più piccoli ed esprimono sulla loro superficie in elevata concentrazione HLA-DR, CD11c, CX3CR1 e CCR5 ed una quantità molto bassa di CCR2;

- i monociti “intermedi” CD14⁺⁺CD16⁺ rappresentano circa il 5% dei monociti totali e differiscono dai monociti non classici in quanto esprimono un'elevata concentrazione di CCR2 sulla loro superficie.

I monociti CD16⁺ presentano un fenotipo simile ai macrofagi, un'elevata capacità di adesione alle cellule endoteliali ed una spiccata attività di presentazione dell'antigene. Sono, inoltre, in grado di rilasciare alti livelli di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6, TNF α ed IFN- γ e bassi livelli di citochine anti-infiammatorie come l'IL-10 a differenza dei monociti CD16⁻. I monociti CD16⁺, quindi, aumentano in condizioni di infiammazione come le infezioni (Waterhouse DF et al. 2008) ma anche in patologie croniche con un basso grado di infiammazione come le patologie cardiovascolari (Schlitt A et al. 2004).

Diversi studi clinici dimostrano che l'alterazione dei livelli delle sottopopolazioni monocitarie è associata all'insorgenza di diverse patologie cardiovascolari come l'aterosclerosi infatti l'equilibrio tra attivazione ed inibizione dei due tipi cellulari è fondamentale per la risoluzione del processo infiammatorio.

I monociti circolanti, quindi, migrano dal torrente circolatorio a livello della lesione aterosclerotica e differenziano in macrofagi. I macrofagi infiltrati fagocitano le oxLDL, diventano cellule schiumose e, insieme alle cellule muscolari lisce, possono andare incontro sia a morte programmata (apoptosi) sia a necrosi rilasciando il loro contenuto cellulare, in particolare lipidi e cristalli di colesterolo, nel core necrotico i quali contribuiscono alla cronicizzazione del processo infiammatorio.

Contemporaneamente i monociti rilasciano citochine e chemochine che richiamano ed attivano i linfociti nel sito dell'infiammazione; questa fase indica una stretta interazione tra risposta immunitaria innata ed adattativa a livello della lesione aterosclerotica (**Figura 2.5**).

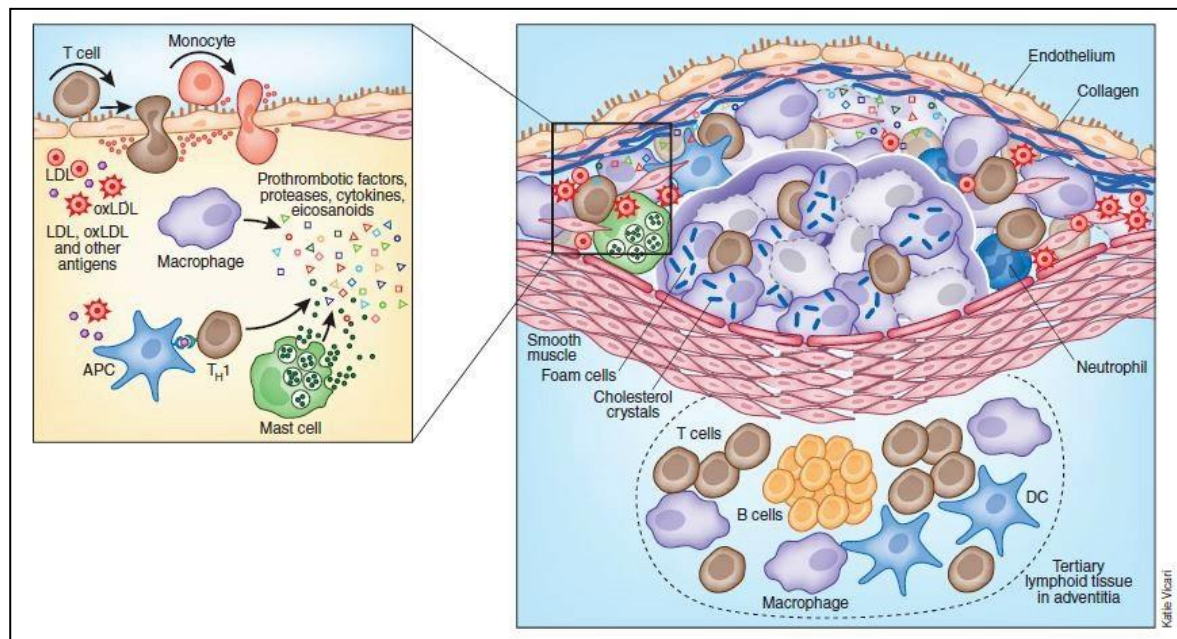


Figura 2.5 Interazione tra risposta immunitaria innata ed adattativa all'interno della lesione aterosclerotica. (Hansson GK, Hermansson A. Nat Immunol 2011)

2.2 Il ruolo della risposta immunitaria adattativa nell'Aterosclerosi

I componenti della risposta immunitaria adattativa sono presenti nelle placche umane durante tutte le fasi del processo aterosclerotico.

La progenie del modello murino di aterosclerosi ApoE^{-/-} incrociato con topi mancanti di linfociti sia B che T in quanto deficienti del gene 1 (RAG1) o del gene 2 (RAG2) della ricombinasi presentano lesioni aterosclerotiche meno sviluppate (Zhou, X et al. 2000) a dimostrazione del ruolo fondamentale svolto dall'immunità adattativa nel processo aterosclerotico.

Le cellule dell'immunità adattativa principalmente coinvolte, quindi, sono i linfociti T e la classe maggiormente responsabile è quella dei linfociti T CD4⁺ (**Figura 2.6**).

Le cellule T CD4⁺ rappresentano un gruppo eterogeneo che comprende cellule sia pro che anti-infiammatorie.

In seguito al rilascio di specifiche citochine da parte delle APC ed al riconoscimento dell'antigene esposto sulla superficie di tali cellule associato a MHC di classe II (complesso maggiore di istocompatibilità di classe II), i linfociti T CD4⁺ possono differenziare in linfociti T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17) ed in linfociti T regolatori (Treg).

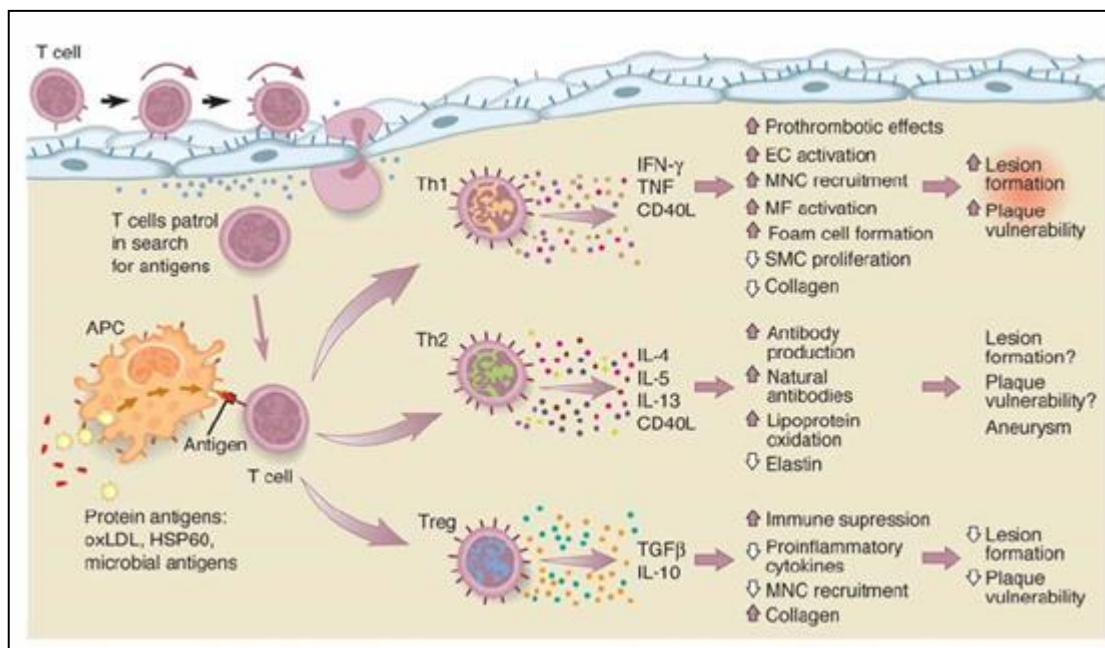


Figura 2.6 Ruolo delle cellule T nel processo aterosclerotico. Le cellule T entrano nella placca aterosclerotica dove vengono esposte ad antigeni presentati dalle cellule dendritiche (DC) o dai macrofagi. Se la presentazione dell'antigene avviene ad opera di una DC attivata, le cellule T CD4+ differenzieranno in linfociti Th1 che secernono IFN- γ e TNF- α ; se invece avviene ad opera di una DC tollerogena differenzieranno in linfociti Treg che secernono IL-10 e TGF- β . Nelle placche sono presenti anche linfociti T CD8+, la cui attività deve essere ancora ben definita, e linfociti Th17 che con la loro attività pro-infiammatoria alimentano il processo aterosclerotico.

I monociti esposti a citochine pro-infiammatorie nella placca vengono attivati e differenziano in macrofagi che fagocitano le oxLDL e formano le cellule schiumose contribuendo alla progressione ed alla destabilizzazione della placca.

I linfociti Th1 favoriscono il processo aterosclerotico infatti sono presenti all'interno delle placche ed in topi mancanti di IFN- γ o del suo recettore (Buono, C. et al. 2003), o di IL-12 (Hauer, A.D. et al. 2005) o IL-18 (Elhage, R. et al. 2003), oppure del fattore trascrizionale Tbet (Buono, C. et al. 2005) presentano lesioni aterosclerotiche di minori dimensioni.

Nonostante ciò, recenti evidenze suggeriscono che la complessa patogenesi dell'ATS non possa essere imputata esclusivamente all'azione svolta da questa sottopopolazione linfocitaria. I linfociti T helper 17 rappresentano una classe di cellule T CD4+ che ha recentemente riscosso interesse. Sono chiamati così perché producono l'interleuchina-17 (IL-17) e sono importanti in quanto conferiscono protezione da funghi e batteri extracellulari soprattutto a livello della superficie mucosale, ma possono anche causare infiammazioni croniche e sono coinvolti nei processi autoimmuni.

La differenziazione delle cellule T naive in linfociti T helper 17 richiede l'attivazione del

fattore trascrizionale ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor γ t) in presenza di IL-6 e del fattore trascrizionale STAT3. Sono stati effettuati diversi studi per cercare di identificare il pathway responsabile dell'induzione del differenziamento. È stato dimostrato che l'IL-23 non è indispensabile per indurre il differenziamento dei linfociti T naive in Th17 in quanto esprimono bassi livelli del recettore di IL-23 (IL-23R) (Zhou L. et al. 2008) ma il signaling attivato dall'IL-23 è fondamentale per il differenziamento terminale, l'espansione ed il mantenimento del fenotipo Th17 (McGeachy M.J. et al. 2009). Infatti, linfociti difettivi di IL-23R non sono in grado di produrre IL17 in vivo (Bettelli, E et al. 2006). Invece, il signaling attivato dall'IL-6 induce l'espressione del recettore di IL-23 e induce la fosforilazione e la traslocazione nel nucleo di STAT3, uno step cruciale nelle prime fasi del differenziamento dei Th17. STAT3 fosforilato nel nucleo induce l'espressione dei geni che codificano per ROR γ t, IL17 e IL23R. ROR γ t è il principale regolatore trascrizionale dei Th17 infatti topi deficienti di ROR γ t mancano delle principali cellule produttrici di IL17 (Ivanov I.I. et al. 2006).

Il TGF- β è un'altra citochina coinvolta nel differenziamento dei Th17 anche se ci sono studi contrastanti riguardo la sua attività. Ad alte concentrazioni è in grado di downregolare l'espressione dell'IL-23R e quindi inibire l'espansione dei Th17 mentre, al contrario, è in grado di indurre il differenziamento dei linfociti Treg (Ghoreschi K et al. 2010). Il pathway attivato dal TGF- β , quindi, è in grado di indurre l'espressione sia di ROR γ t nei Th17 che di FoxP3 nei Treg: in assenza della citochina pro-infiammatoria IL-6 viene attivato il Foxp3 che inibisce l'attività di ROR γ t favorendo quindi il differenziamento in Treg; in presenza invece di IL-6, IL-21 e IL-23 viene inibito il Foxp3, attivata l'espressione di ROR γ t e l'equilibrio Treg/Th17 si sposta verso il lineage dei Th17 (Zhou L. et al. 2008).

Sono state individuate diverse sottopopolazioni di linfociti T regolatori, la cui caratteristica comune è la capacità di sopprimere l'attivazione, la proliferazione, la differenziazione e le funzioni di molte cellule effettrici come i linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, linfociti B, cellule NK e cellule dendritiche soprattutto mediante il rilascio di IL-10, citochina con una forte attività anti-infiammatoria.

I linfociti Treg sono caratterizzati dall'espressione del fattore trascrizionale Foxp3 che può essere definito il master gene del differenziamento delle cellule T regolatorie nel timo ed in periferia in quanto gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della specificità e del programma funzionale di questo tipo di cellule T (Hori et al. 2003). Sono state identificate due classi di linfociti Treg che esprimono Foxp3: i linfociti Treg naturali (nTreg) che

esprimono sulla loro superficie il CD4 ed il CD25 (la subunità α del recettore per l'interleuchina 2) e producono IL-10, ed i linfociti Treg indotti (iTreg) che producono il TGF- β (Curotto de Lafaille MA and Lafaille JJ 2009).

Purtroppo però, mentre l'espressione di Foxp3 appare una prerogativa esclusiva delle cellule Treg nel topo, lo stesso non si può dire dell'uomo, in cui Foxp3 può essere espresso temporaneamente nei linfociti T attivati indipendentemente dalla funzione regolatoria, perdendo quindi il ruolo di marcatore specifico di Treg.

La maggior parte delle cellule T CD4+ naive esprime un marcatore di membrana detto CD45, del quale una parte è codificata da un esone detto A da cui deriva l'appellativo CD45RA (restricted A). Per contro la maggior parte delle cellule T attivate e di memoria non presenta il segmento codificato dall'esone A perché questo è stato eliminato per splicing alternativo, ma esprime una isoforma del marcatore detta CD45RO. Le cellule T CD45RA⁻ Foxp3^{high} rilasciano scarsamente IL-2 e IFN γ e hanno quindi attività anti-infiammatoria, le cellule T CD45RA⁺ Foxp3^{low} ne producono poche, mentre le cellule T CD45RA⁻ Foxp3^{low} producono le due citochine in grande quantità rivelando così un'intensa attività pro-infiammatoria. Le cellule T CD45RA⁻ Foxp3^{low} esprimono inoltre il fattore trascrizionale ROR γ t e producono la citochina IL-17; questo indica la presenza di una stretta relazione tra queste cellule ed i linfociti Th17. (Miyara et al. 2009).

Questi risultati indicano che l'attività e la concentrazione delle diverse popolazioni di cellule esprimenti Foxp3 è fondamentale per una corretta valutazione dello stato immunologico di un paziente e che la manipolazione di una specifica subpopolazione può aumentare oppure attenuare la risposta infiammatoria.

Allo stesso modo, a differenza del topo, anche il CD25 non rappresenta un marker espresso esclusivamente dalle cellule Treg nell'uomo ma viene espresso in minore concentrazione anche da altri tipi di linfociti attivati. Nel topo sia i linfociti Treg CD4+ che esprimono in elevata concentrazione il CD25 (CD4+CD25^{high}) sia quelli che lo esprimono in bassa concentrazione (CD4+CD25^{low}), hanno attività inibitoria *in vitro* su cellule T attivate che non esprimono il CD25 (CD4+CD25⁻). Tra i linfociti T, invece, prelevati dal sangue periferico dell'uomo solo quelli che esprimono in elevata quantità il CD25 svolgono attività inibitoria. Anche se non è ben chiaro il meccanismo attraverso il quale viene indotta l'inibizione della proliferazione e della secrezione di citochine pro-infiammatorie, è stato dimostrato che nell'uomo solo i linfociti Treg CD4+ che esprimono in elevata quantità il CD25 sulla loro

superficie esplicano questa attività, a differenza delle cellule CD4+CD25^{low} che, nonostante esprimano questo marcatore sulla loro superficie, non sono in grado di attivare l'inibizione (Baecher-Allan Clare et al. 2001). Quindi il CD25 nell'uomo non è un marcatore esclusivo delle Treg in quanto viene espresso anche da cellule T effettrici in seguito alla loro attivazione da parte dell'antigene, anche se generalmente il livello di espressione non raggiunge mai quello delle Treg.

Nonostante nessuno dei marcatori ad oggi disponibili sia esclusivo dei linfociti Treg, la presenza contemporanea del CD25 e del Foxp3 ed il loro livello di espressione, li rende il migliore strumento per identificare fenotipicamente questa popolazione cellulare.

Recentemente però, è stato individuato il LAG-3 (gene 3 di attivazione linfocitaria), un marker espresso sulla superficie delle cellule principali produttrici di IL-10.

Il LAG3 (CD223) è una proteina di membrana appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline che è espressa principalmente sulla superficie delle cellule natural killer e dei linfociti T (Triebel et al. 1990). Il LAG3 è un omologo del CD4 ed i geni codificanti per queste proteine sono posizionati sul cromosoma 12 e molto vicini tra loro.

Il LAG3 sia nel topo che nell'uomo riconosce e lega il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) con alta affinità. Il LAG3 sembra essere fondamentale per espletare la massima funzione regolatoria dei CD4+CD25+FoxP3+ Treg (Huang et al. 2004). Inoltre, l'espressione ectopica di LAG3 conferisce l'attività regolatoria nelle cellule T naive. Il LAG3 espresso sui linfociti Treg CD4+CD25+ lega l'MHC II sulle cellule dendritiche immature nelle quali attiva un signaling inibitorio che sopprime la loro attività di presentazione dell'antigene (Liang et al. 2008).

È stato dimostrato che il LAG3 è espresso sulla superficie di una popolazione di cellule T di memoria CD4+CD25- che include una sottopopolazione di cellule T che non esprimono il FoxP3 (CD4+ FoxP3-). Queste cellule sono in grado di produrre un'elevata quantità di IL-10 in seguito a stimolazione antigenica in vitro (Cretney E. et al. 2011)

Il FoxP3, quindi, risulta non essere essenziale per permettere alle cellule Treg LAG3+ di espletare la propria funzione inibitoria.

3. L'interazione tra l'immunità innata e adattativa nel processo aterosclerotico

Esiste una stretta interazione tra risposta immunitaria innata ed adattativa all'interno della lesione aterosclerotica. La prima popolazione che sopraggiunge a livello della lesione parietale è quella dei monociti, una popolazione eterogenea le cui sottopopolazioni svolgono attività infiammatorie opposte: i monociti classici (CD14⁺⁺CD16⁻) sono principalmente coinvolti nella risposta immunitaria innata contro i patogeni; i monociti intermedi (CD14⁺⁺CD16⁺) ricoprono preminentemente un ruolo pro-infiammatorio mentre i monociti non classici (CD14⁺CD16⁺⁺) svolgono un'attività di sorveglianza dei tessuti.

Recenti studi indicano che i livelli dei monociti CD16⁺ aumentano in diverse patologie infiammatorie come anche nell'aterosclerosi infatti l'aumento dei monociti intermedi CD14⁺⁺CD16⁺ potrebbe essere un fattore di aumento del rischio di sviluppare eventi cardiovascolari in quanto associato alla probabilità di rottura e complicazione della placca aterosclerotica. (Yamamoto H et al. 2018). I monociti rilasciano citochine e chemochine che richiamano ed attivano i linfociti nel sito dell'infiammazione. Inizialmente i linfociti Th1 e Th2 erano ritenute le sottopopolazioni linfocitarie principalmente coinvolte. Tuttavia, recentemente, l'attenzione si è spostata sui Th17 e sui Treg il cui equilibrio risulta alterato nei pazienti con placche aterosclerotiche. Infatti, è stato evidenziato che nei pazienti con placche aterosclerotiche carotidee instabili c'è un rilevante squilibrio funzionale tra Th17 e Treg e che i Th17 potrebbero favorire l'aterogenesi, mentre i Treg potrebbero avere un ruolo protettivo inibendo la formazione della placca (Liu Zhen-dong et al. 2012).

I linfociti Treg e Th17 mantengono quindi un certo equilibrio nel sangue periferico di soggetti sani che viene invece perso in soggetti affetti da diverse patologie infiammatorie ed autoimmuni. Questo squilibrio è stato rinvenuto in pazienti affetti dal Lupus Eritematoso Sistemico (SLE) con placche aterosclerotiche localizzate a livello delle arterie coronarie. L'incidenza di patologie cardiovascolari in pazienti affetti da SLE è in aumento e rappresenta la causa primaria di morte nelle fasi avanzate della patologia. Il Lupus è una patologia autoimmune quindi si potrebbe pensare che tale squilibrio potrebbe essere dovuto alla patologia in sé. Tuttavia, è stato dimostrato che tale squilibrio risulta più accentuato in pazienti affetti sia da SLE che da aterosclerosi rispetto a pazienti affetti esclusivamente da SLE. È stata infatti misurata una concentrazione maggiore di Th17, IL-17, IL-6 e TNF α e minore di Treg e IL-10 nel sangue periferico dei pazienti con SLE e aterosclerosi rispetto a pazienti affetti solo da SLE (Zhu Mengya et al. 2013).

In diversi studi è stato dimostrato un ruolo protettivo dei vari subsets di linfociti T regolatori in modelli murini di aterosclerosi. I linfociti Treg esprimono il FoxP3 sono stati ritrovati nelle placche sia di topo che di uomo anche se in basse concentrazioni (Veillard N.R et al. 2004, de Boer, O.J. et al. 2007). Le citochine IL-10 e TGF- β rilasciate dai Treg svolgono un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi ma va comunque tenuto a mente che queste non vengono prodotte esclusivamente da questa popolazione cellulare. L'effetto atero-protettivo dei Treg è stato studiato in topi che presentano basse concentrazioni di Treg in quanto difettivi del CD80, CD86 o CD28, componenti del pathway di costimolazione dei linfociti T, che presentano una forma aggressiva di aterosclerosi. L'infusione di linfociti Treg FoxP3+ rallenta la progressione del processo aterosclerotico (Ait-Oufella H. et al. 2006).

Sebbene non siano presenti in letteratura importanti studi che descrivano il ruolo dei linfociti Treg CD4+CD25-LAG3+ nel processo aterosclerotico, è stato dimostrato che questi sono in grado di sopprimere la risposta dei linfociti B e la produzione di anticorpi mediante il rilascio di elevate quantità di TGF- β 3 in pazienti affetti da SLE (Okamura et al. 2015). Questi dati dimostrano come in una patologia autoimmune come il Lupus è possibile osservare una stretta comunicazione tra le diverse classi linfocitarie coinvolte nella risposta infiammatoria. È molto interessante notare che nella placca aterosclerotica coronarica, infatti, sono stati individuati anche i linfociti di tipo B; questi sono presenti e maturano a livello delle placche aterosclerotiche coronariche favorendo la progressione della lesione aterosclerotica (Burioni R, et al.2009). Potrebbe essere ipotizzato che in soggetti predisposti l'esposizione ad antigeni, come avviene nelle infezioni, potrebbe aumentare il rischio di sviluppare patologie vascolari come l'aterosclerosi e la dissecazione aortica andando ad influenzare la risposta immunitaria. È stato osservato che esiste una stretta correlazione tra l'attivazione di una reazione infiammatoria in risposta alla presenza di agenti infettivi e l'insorgenza di placche aterosclerotiche (Gredmark-Russ S et al. 2009). Al contrario, però, in altri studi è stato dimostrato che i linfociti B svolgono un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi. La splenectomia aggrava l'aterosclerosi in topi ApoE KO e l'infusione in questi topi di linfociti B provenienti da topi ApoE KO con aterosclerosi in fase avanzata, provoca un miglioramento delle lesioni aterosclerotiche nei topi riceventi (Caligiuri, G. et al 2002). In linea con questo risultato, topi Ldlr KO che mancano di IL-5, la principale citochina che promuove l'espansione dei linfociti B di tipo 1 (linfociti B-1), presentano una minore concentrazione di anticorpi di tipo IgM (immunoglobulina M) contro le fosfolipine e maggiore aterosclerosi

(Binder C.J. et al. 2004). Al contrario invece, l'infusione di linfociti di tipo B-2 ma non di quelli di tipo B-1, ha un effetto pro-aterosclerotico (Kyaw T. et al. 2010) suggerendo che diversi subsets di linfociti B svolgono un ruolo contrastante nei confronti di questa patologia.

Inoltre, sono stati osservati anticorpi contro le fosfocoline e le oxLDL che sembra svolgano un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi in quanto in topi ipercolesterolemici immunizzati con anticorpi contro le fosfocoline e anti-oxLDL presentano un decorso della patologia più favorevole (Ameli S. et al. 1996).

La presenza di diverse popolazioni di linfociti T regolatori e di linfociti Th17 con attività pro-infiammatoria e di comuni pathway di differenziamento dimostra che il sistema immunitario deve riuscire a mantenere un importante equilibrio tra queste popolazioni linfocitarie, un equilibrio che è fondamentale anche per il contenimento del processo aterosclerotico.

In conclusione, si può affermare che l'aterosclerosi è una patologia multifattoriale innescata da diversi fattori di stress cellulare ed alimentata dai mediatori dell'infiammazione che vengono richiamati nella lesione aterosclerotica. La diversa attivazione immunitaria può orientare la progressione dell'aterosclerosi verso la formazione della placca con conseguente occlusione dell'arteria interessata oppure verso la dissecazione della parete arteriosa. Studiare il complesso meccanismo che sta alla base del processo infiammatorio che avviene durante l'insorgenza e lo sviluppo della lesione parietale può permettere l'identificazione di nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle patologie cardiovascolari. Diversi tentativi sono stati fatti dai vari gruppi di ricerca per identificare quella popolazione cellulare o quel gruppo di mediatori che guidano il processo aterosclerotico.

La continua scoperta di nuove sottopopolazioni immunitarie che svolgono attività contrastanti ed il fine equilibrio dell'attività e della concentrazione di queste popolazioni che deve essere mantenuto dal sistema immunitario, rappresenta un interessante aspetto da studiare per la comprensione del complesso processo infiammatorio che caratterizza le diverse patologie cardiovascolari.

Capitolo III

Scopo del lavoro

Lo sviluppo della placca aterosclerotica è una delle conseguenze dell'alterazione dell'equilibrio ossidativo e del metabolismo fisiologico, ma soprattutto dello stato infiammatorio di un individuo. Le cellule del sistema immunitario che danno inizio al processo infiammatorio sono i monociti-macrofagi; successivamente agiscono i linfociti che aderiscono all'endotelio non funzionale e si accumulano a livello della tonaca intima della parete delle arterie.

Il reclutamento delle diverse popolazioni cellulari e la progressione della lesione aterosclerotica verso una placca stabile o instabile o verso la dissecazione della parete arteriosa sono strettamente correlate ad uno squilibrio tra fattori pro-aterogeni ed anti-aterogeni.

È stato dimostrato che alterazioni della percentuale delle diverse popolazioni monocitarie e linfocitarie e quindi anche della loro attività sono alla base di diverse patologie infiammatorie che affliggono il sistema cardiovascolare, tra cui l'aterosclerosi.

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati i subsets monocitari e linfocitari in pazienti che presentavano placche aterosclerotiche carotidee con stenosi maggiore del 70% sottoposti a tromboendarteriectomia (TEA) ed in pazienti con dissecazione acuta dell'aorta di tipo A di Stanford; in particolare sono stati analizzati i monociti classici CD14⁺⁺CD16⁻, i monociti intermedi CD14⁺⁺CD16⁺, i monociti non classici CD14⁺CD16⁺⁺, i linfociti T helper 17 CD4⁺IL-17⁺, i linfociti T regolatori CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, la sottopopolazione dei linfociti T regolatori CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻LAG3⁺ e i linfociti B CD19⁺.

Queste popolazioni sono state quantizzate mediante analisi citofluorimetrica dei PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) estratti dal sangue periferico dei pazienti coinvolti nello studio. I dati ottenuti sono stati paragonati a quelli di un gruppo di controllo costituito da soggetti che presentano i principali fattori di rischio dell'aterosclerosi, come l'ipertensione, la dislipidemia, l'ipercolesterolemia, il diabete e il fumo.

Il nostro è stato uno studio osservazionale che ha avuto come scopo ultimo quello di andare ad approfondire come il processo aterosclerotico possa evolvere verso diverse condizioni patologiche e come possa essere orientato dalle diverse popolazioni del sistema immunitario. Infatti, l'alterazione dell'equilibrio tra le varie popolazioni cellulari pro-infiammatorie ed anti-

infiammatorie può influenzare la progressione del processo aterosclerotico verso una placca stabile, instabile o verso la dissecazione della parete arteriosa.

Capitolo IV

Materiali e metodi

1. Popolazione di studio

In questo lavoro sono stati coinvolti 75 pazienti consecutivi che presentavano una stenosi carotidea maggiore del 70% sottoposti a tromboendoarteriectomia (TEA) presso il Dipartimento di Chirurgia Vascolare dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Università degli studi di Roma "La Sapienza". Di questi pazienti, 51 presentava una stenosi carotidea critica asintomatica (CAS-A) e 24 pazienti una stenosi carotidea critica sintomatica (CAS-S) in quanto sono andati incontro ad ictus.

L'altro gruppo coinvolto nello studio è formato da 40 pazienti che presentavano una dissecazione acuta dell'aorta di tipo A di Stanford e reclutati presso il Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Respiratorie, Nefrologiche, Anestesiologiche e Geriatriche del Policlinico "Umberto I", Università degli studi di Roma "La Sapienza".

Sono stati usati come controllo un gruppo di 49 pazienti (RF) paragonabili per età e sesso ai pazienti coinvolti nello studio e che presentavano i principali fattori di rischio cardiovascolare.

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti sono riportate nella **Tabella 4.1**.

Di seguito sono elencati i criteri di inclusione ed esclusione utilizzati per la selezione dei pazienti inclusi nello studio.

Nella selezione dei pazienti di controllo RF sono stati seguiti i seguenti criteri di esclusione:

- stenosi carotidea > 20%;
- sintomi cerebrovascolari acuti o anamnesi positiva per malattia cardiovascolare;
- anamnesi positiva per neoplasie, malattie sistemiche infiammatorie o autoimmuni;
- sindromi genetiche causa di patologia aortica;
- anamnesi personale o familiare positiva per aneurisma o dissezione aortica.

I gruppi CAS-A e CAS-S sono formati da pazienti con stenosi carotidea critica definita come restringimento del lume carotideo $\geq 70\%$; i pazienti sintomatici CAS-S inclusi presentano ictus o attacco ischemico transitorio (TIA).

Criteri di esclusione utilizzati nella selezione sono:

- anamnesi positiva per neoplasie, malattie sistemiche infiammatorie o autoimmuni;

- anamnesi personale o familiare positiva per aneurismi o dissezione aortica.

Nella selezione dei pazienti con dissecazione acuta dell'aorta di tipo A di Stanford, ovvero con dissecazione dell'aorta ascendente, i criteri di esclusione dallo studio utilizzati sono:

- anamnesi positiva per neoplasie, malattie sistemiche infiammatorie o autoimmuni;
- sindromi genetiche causa di patologia aortica;
- anamnesi familiare positiva per aneurisma o dissezione aortica.

	Gruppo RF n=49 media±ds	Gruppo CAS-A n=51 media±ds	Gruppo CAS-S N=24 media±ds	Gruppo AAD N=40 media±ds
Età (anni)	61,26±7,45	68,56±6,62	67,25±13,1	61,91±10,22
Sesso	24/49	18/51	7/24	11/40
Femminile (%)	(48,98%)	(35,29%)	(29,16%)	(27,50%)
Diabete	10/49 (20,40%)	20/51 (39,21%)	6/24 (25%)	4/40 (10%)
Dislipidemia	36/49 (73,46%)	38/51 (74,50%)	20/24 (83,33%)	18/40 (45%)
Ipertensione	37/49 (75,51%)	47/51 (92,15%)	17/24 (70,83%)	40/40 (100%)
Fumo	17/49 (34,69%)	24/51 (47,05%)	15/24 (62,5%)	-
BMI (n)	25,60±1,92	24,71±2,47	24,74±2,73	-

2. Estrazione dei PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) dal sangue periferico

I PBMC sono stati ottenuti da sangue periferico dei pazienti.

Dopo aggiunta di eparina, i campioni sono stati diluiti con Hanks' Balanced Salt Solution (HANK'S) 1X (Euroclone) in rapporto 1:2. Circa 30-35 ml di sangue diluito sono stati stratificati delicatamente su 15 ml di Lympholyte-H (Cederlane) e quindi centrifugati per 30 minuti alla velocità di 800 rcf ed alla temperatura di 21°C, senza freno ed accelerazione per favorirne la stratificazione. I PBMC sono stati recuperati dall'interfaccia tra Lympholyte-H e plasma e lavati tre volte con HANK'S 1X in un volume totale di 50 ml come segue:

- I° lavaggio: 20 minuti alla velocità di 650 rcf;
- II° lavaggio: 15 minuti alla velocità di 580 rcf;
- III° lavaggio: 10 minuti alla velocità di 580 rcf.

I PBMC sono stati risospesi in Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X (SIGMA) e contati al microscopio utilizzando la camera contaglobuli di Burkner, quindi centrifugati per 10 minuti alla velocità di 580 rcf.

Le cellule sono state risospese in RPMI 1640 (Euroclone) 2 mM L-glutamina (Euroclone), 100 U/ml penicillina/streptomicina (Euroclone), 10% FBS (foetal bovine serum) (Euroclone) ed incubate over night a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

3. Analisi FACS delle popolazioni immunitarie di studio

I PBMC isolati come descritto precedentemente, sono stati utilizzati per analizzare le sottopopolazioni monocitarie, i linfociti Th17, i linfociti Treg e la sottopopolazione di Treg LAG3+, e i linfociti B mediante FACS Calibur in seguito a marcatura con anticorpi specifici per ciascuna popolazione. Per l'identificazione di specifici antigeni di superficie e di marcatori intracellulari sono stati utilizzati tre colori di fluorescenza. Gli anticorpi impiegati sono coniugati a APC (Allofococianina), a FITC (Fluorescina Isotiocianato) o a PE (Ficoeritrina).

Per la marcatura dei monociti classici, intermedi e non classici sono stati utilizzati:

- un anticorpo coniugato al FITC che riconosce il CD14;
- un anticorpo coniugato a APC che riconosce il CD16;
- un anticorpo coniugato al PE che riconosce HLA-DR.

Per la marcatura dei linfociti T helper 17 sono stati utilizzati:

- un anticorpo coniugato ad APC che riconosce il CD4;
- un anticorpo coniugato al PE che riconosce l'IL-17 intracellulare.

Per la marcatura dei linfociti T regolatori sono stati utilizzati:

- un anticorpo coniugato ad APC che riconosce il CD4;
- un anticorpo coniugato al FITC che riconosce il CD25;
- un anticorpo coniugato al PE che riconosce il Foxp3 intracellulare;
- un anticorpo coniugato a PerCP5.5 che riconosce il LAG3+.

Per la marcatura dei linfociti B sono stati utilizzati:

- un anticorpo coniugato a PE che riconosce il CD19;
- un anticorpo coniugato a FITC che riconosce il CD3 utilizzato per la selezione negativa dei linfociti T.

Per ogni anticorpo (BD Bioscience) è stato utilizzato il rispettivo controllo isotipico come controllo per la compensazione e per confermare la specificità degli anticorpi.

I kits Human FoxP3 buffer set (BD Pharmigen) E Cytotfix/Cutoperm kit (BD Pharmigen) sono stati utilizzati per fissare e permeabilizzare le cellule durante la marcatura dei linfociti Treg e Th17, rispettivamente.

L'analisi FACS è stata effettuata utilizzando il citofluorimetro FACS Calibur (Becton–Dickinson) e il software Cell Quest Pro.

3.1 Marcatura dei subsets monocitari per l'analisi al FACS

I PBMC isolati dal sangue periferico sono stati diluiti con Stain Buffer (PBS con l'1% di FBS) alla concentrazione di $1 \cdot 10^6/100\mu\text{l}$ cellule e trasferiti in tubi FACS.

Le cellule sono state centrifugate alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C, il sovrnatante è stato rimosso aspirandolo delicatamente e le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di $1 \cdot 10^6$ cellule/100 μl . Sono stati aggiunti 7 μl di anticorpo anti-CD14 (o controllo isotipico) al campione che è stato poi vortexato ed incubato per 20 minuti in ghiaccio protetto dalla luce. Successivamente le cellule sono state lavate aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Il sovrnatante è stato aspirato delicatamente, le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di $1 \cdot 10^6$ cellule/100 μl e sono stati aggiunti 7 μl di anticorpo anti-CD16 (o controllo isotipico). Il campione è stato vortexato ed incubato per 20 minuti in ghiaccio protetto dalla luce, quindi

è stato lavato aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Il sovrinatante è stato aspirato delicatamente, le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l e sono stati aggiunti 7 μ l di anticorpo anti-HLA-DR (o controllo isotipico). Il campione è stato vortexato ed incubato per 20 minuti in ghiaccio protetto dalla luce, quindi è stato lavato aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Infine il sovrinatante è stato rimosso delicatamente e le cellule sono state risospese in 300 μ l di Stain Buffer ed analizzate al FACS.

3.2 Marcatura dei linfociti T helper 17 per l'analisi al FACS

I PBMC isolati dal sangue periferico ed incubati, sono stati stimolati con 50 ng/ml di PMA (1 metossi 2-propilacetato-SIGMA), 750 ng/ml di Ionomicina (SIGMA), 0,67 μ l/ml di Monensina (BD) in terreno RPMI 10% FBS per 4 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l, trasferite in tubi FACS e centrifugate alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Dopo aver rimosso il sovrinatante delicatamente, le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l e sono stati aggiunti 7 μ l di anticorpo anti-CD4 (o controllo isotipico) al campione che è stato poi vortexato ed incubato per 30 minuti in ghiaccio protetto dalla luce. Il campione è stato quindi lavato con 1 ml di Stain Buffer e centrifugato alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C per 2 volte. Dopo aver rimosso delicatamente il sovrinatante, le cellule sono state risospese in 250 μ l di Fixation/Permeabilization solution, incubate per 20 minuti in ghiaccio protette dalla luce, e quindi lavate 2 volte con 1 ml di 1X BD Perm/Wash Buffer centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Le cellule sono state risospese in 50 μ l di 1X BD Perm/Wash Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l; sono stati aggiunti 7 μ l di anticorpo anti-IL-17 (o controllo isotipico) al campione che è stato poi vortexato ed incubato per 30 minuti in ghiaccio protetto dalla luce. Le cellule sono state quindi lavate con 1 ml 1X BD Perm/Wash Buffer mediante centrifugazione alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C per 2 volte. Infine il sovrinatante è stato rimosso delicatamente e le cellule sono state risospese in 300 μ l di Stain Buffer ed analizzate al FACS.

3.3 Marcatura delle popolazioni di linfociti T regolatori per l'analisi al FACS

I PBMC isolati dal sangue periferico sono stati risospesi in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l e trasferiti in tubi FACS.

Le cellule sono state centrifugate alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C, il sovrnatante è stato rimosso aspirandolo delicatamente e le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l.

Sono stati aggiunti 7 μ l di anticorpo anti-CD4 (o controllo isotipico) al campione che è stato poi vortexato ed incubato per 20 minuti in ghiaccio protetto dalla luce, le cellule sono state poi lavate aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Il sovrnatante è stato aspirato delicatamente, le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l e sono stati aggiunti 7 μ l di anticorpo anti-CD25 (o controllo isotipico). Il campione è stato vortexato ed incubato per 20 minuti in ghiaccio protetto dalla luce, quindi è stato lavato aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Il sovrnatante è stato aspirato delicatamente, le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l e sono stati aggiunti 7 μ l di anticorpo anti-LAG3 (o controllo isotipico). Il campione è stato vortexato ed incubato per 30 minuti in ghiaccio protetto dalla luce, quindi è stato lavato aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Il sovrnatante è stato rimosso aspirando delicatamente, le cellule sono state risospese in 2ml di 1X Human Foxp3 Buffer A, vortexate ed incubate per 10 minuti a temperatura ambiente protette dalla luce. Il campione è stato centrifugato alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C, risospeso in 2 ml di Stain Buffer e centrifugato nuovamente alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 21° C. Dopo aver rimosso il sovrnatante, le cellule sono state risospese in 0.5 ml di 1X working solution Human Foxp3 Buffer C, vortexate ed incubate per 30 minuti a temperatura ambiente protette dalla luce. Dopo aver aggiunto 2 ml di Stain Buffer, le cellule sono state centrifugate alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 21° C, quindi il sovrnatante è stato rimosso e le cellule sono state nuovamente risospese in 2 ml di Stain Buffer e centrifugate a 580rcf per 10 minuti a 21°C. Il sovrnatante è stato rimosso delicatamente e le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di 1×10^6 cellule/100 μ l, quindi sono stati aggiunti 7 μ l di anticorpo anti-Foxp3 (o controllo isotipico), il campione è stato poi vortexato ed incubato per 30 minuti a temperatura ambiente protetto dalla luce. Sono stati aggiunti 2 ml di Stain Buffer ed il campione è stato centrifugato alla

velocità di 580rcf per 10 minuti a 21° C; le cellule sono state risospese nuovamente in 2 ml di Stain Buffer e centrifugate a 580rcf per 10 minuti a 21° C. Infine il sovrantante è stato rimosso delicatamente e le cellule sono state risospese in 300µl di Stain Buffer ed analizzate al FACS.

3.4 Marcatura dei linfociti B per l'analisi al FACS

I PBMC isolati dal sangue periferico sono stati risospesi in Stain Buffer alla concentrazione di $1 \cdot 10^6$ cellule/100µl e trasferite in tubi FACS.

Le cellule sono state centrifugate alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C, il sovrantante è stato rimosso aspirandolo delicatamente e le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di $1 \cdot 10^6$ cellule/100µl. Sono stati aggiunti 7µl di anticorpo anti-CD3 (o controllo isotipico) al campione che è stato poi vortexato ed incubato per 20 minuti in ghiaccio protetto dalla luce, le cellule sono state poi lavate aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Il sovrantante è stato aspirato delicatamente, le cellule sono state risospese in Stain Buffer alla concentrazione di $1 \cdot 10^6$ cellule/100µl e sono stati aggiunti 7µl di anticorpo anti-CD19 (o controllo isotipico). Il campione è stato vortexato ed incubato per 20 minuti in ghiaccio protetto dalla luce, quindi è stato lavato aggiungendo 2 ml di Stain Buffer e centrifugando alla velocità di 580rcf per 10 minuti a 4° C. Infine il sovrantante è stato rimosso delicatamente e le cellule sono state risospese in 300µl di Stain Buffer ed analizzate al FACS.

4. Analisi statistica dei dati

I risultati ottenuti dall'analisi FACS sono stati espressi come valore medio \pm SD. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il test non parametrico One-way ANOVA ed il post test di Bonferroni e i risultati sono stati considerati significativi con un valore di $*p < 0.05$. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma GraphPad Prism 5 software (GraphPad software Inc.).

Capitolo V

Risultati

Le cellule isolate dal sangue periferico dei pazienti mediante gradiente di densità sono state sottoposte a marcatura con anticorpi specifici ed analizzate mediante analisi FACS per determinare la concentrazione delle sottopopolazioni monocitarie e linfocitarie.

1. Analisi delle sottopopolazioni monocitarie

Le cellule sono state selezionate inizialmente in base alle caratteristiche fisiche grandezza e granulosità mediante i parametri FSC e SSC rispettivamente ed è stato disegnato un ampio gate intorno alla popolazione di interesse per escludere i linfociti ed i detriti. Queste cellule sono state poi visualizzate su un plot CD14 vs CD16.

Per evitare che le cellule Natural Killer (NK) che esprimono il CD16 interferissero con la conta dei monociti, questi ultimi sono stati selezionati usando un anticorpo che riconosce l'HLA-DR espresso sulla superficie dei monociti ma non su quella delle NK.

I monociti classici CD14⁺⁺CD16⁻, i monociti intermedi CD14⁺CD16⁺ e i monociti non classici CD14⁺CD16⁺⁺ (**Figura 5.1**), sono stati identificati e quantizzati attraverso l'espressione sulla loro superficie dei marker CD14 e CD16.

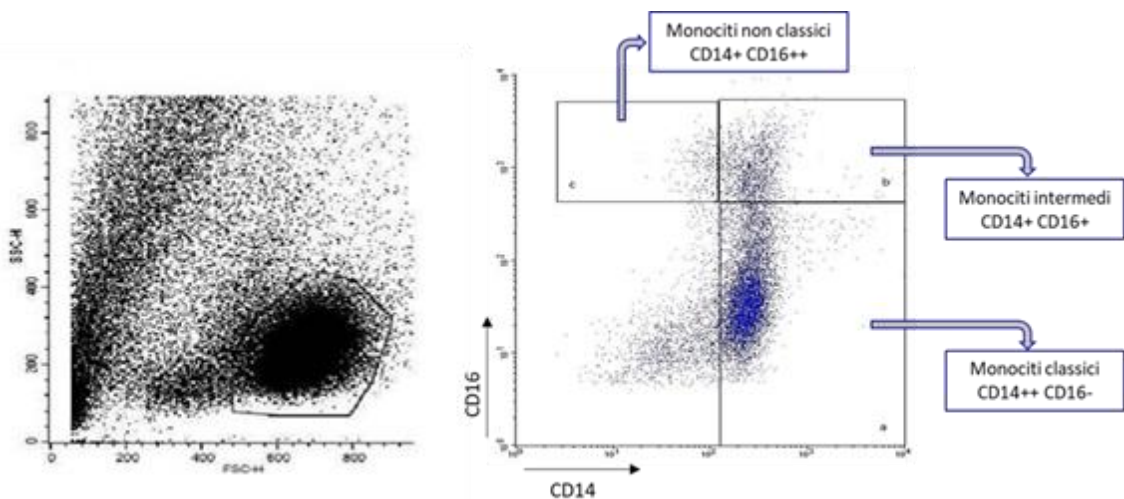


Figura 5.1 Identificazione delle sottopopolazioni monocitarie mediante l'espressione dei marker di superficie CD14 e CD16: a) Monociti classici CD14⁺⁺ CD16⁻ b) Monociti Intermedi CD14⁺ CD16⁺ c) Monociti non classici CD14⁺ CD16⁺⁺

Dall'analisi delle sottopopolazioni monocitarie abbiamo osservato un aumento della percentuale dei monociti classici negli AAD rispetto sia ai CAS ($p < 0.05$) che agli RF ($p < 0.05$) (**Figura 5.2**). I monociti classici svolgono un'attività di protezione nei confronti dei patogeni e una causa di dissecazione in pazienti predisposti è la presenza di infezioni batteriche e virali. Nei monociti non classici non abbiamo osservato differenze statisticamente significative tra i tre gruppi studiati (**Figura 5.3**). Possiamo, però, affermare che la percentuale di questa popolazione diminuisce sia nella stenosi che nella dissecazione rispetto al gruppo di controllo e poiché i monociti non classici svolgono un'attività di sorveglianza dei tessuti, la loro diminuzione e quindi il venir meno di questa loro attività potrebbe essere una concausa dell'insorgenza della patologia.

Per quanto riguarda i monociti intermedi abbiamo riscontrato una riduzione negli AAD rispetto sia ai CAS che agli RF ($p < 0.05$) (**Figura 5.4**). Essendo i monociti intermedi una popolazione con attività prettamente pro-infiammatoria, dalla letteratura si evince che questi siano in grado di orientare la risposta infiammatoria verso una risposta mediata dai Th1 e dai Th17 nella stenosi.

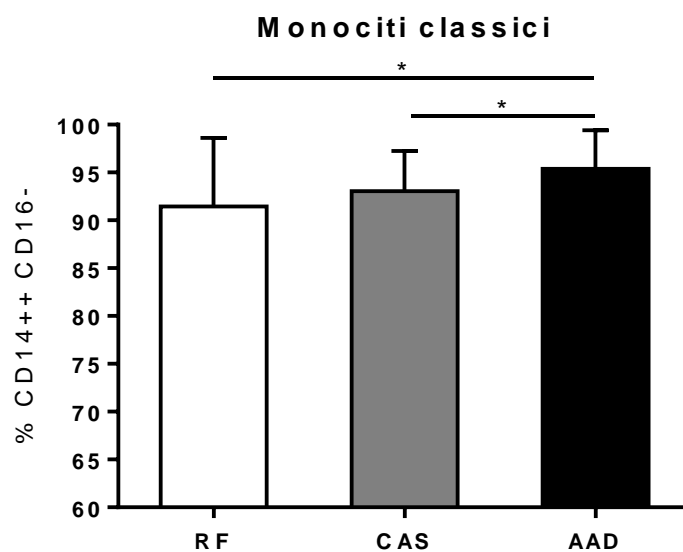


Figura 5.2 Analisi citofluorimetrica della popolazione monocitaria classica; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

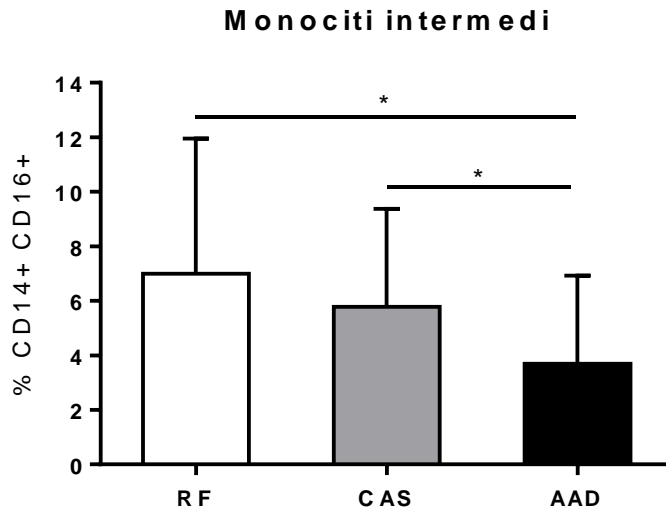


Figura 5.3 Analisi citofluorimetrica della popolazione monocitaria intermedia; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

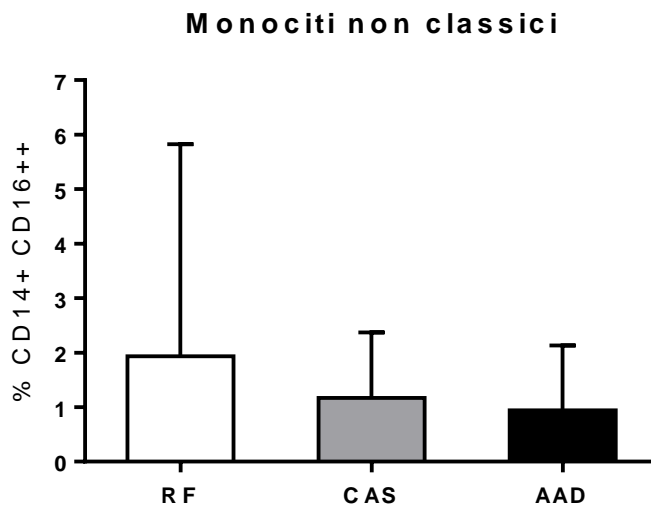


Figura 5.4 Analisi citofluorimetrica della popolazione monocitaria non classica; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2. Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie T CD4+

Le cellule sono state selezionate inizialmente in base alle caratteristiche fisiche grandezza e granulosità mediante i parametri FSC e SSC rispettivamente ed è stato disegnato un ampio gate intorno alla popolazione di interesse per escludere i monociti ed i detriti (**Figura 5.5 A**).

Le cellule sono state poi selezionate in base all'espressione del CD4 (**Figura 5.5 B**).

I risultati relativi all'analisi dei linfociti T CD4+ hanno dimostrato valori significativamente ridotti nei pazienti del gruppo CAS-A ($p < 0.05$), CAS-S ($p < 0.05$) e AAD ($p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo RF (**Figura 5.6**).

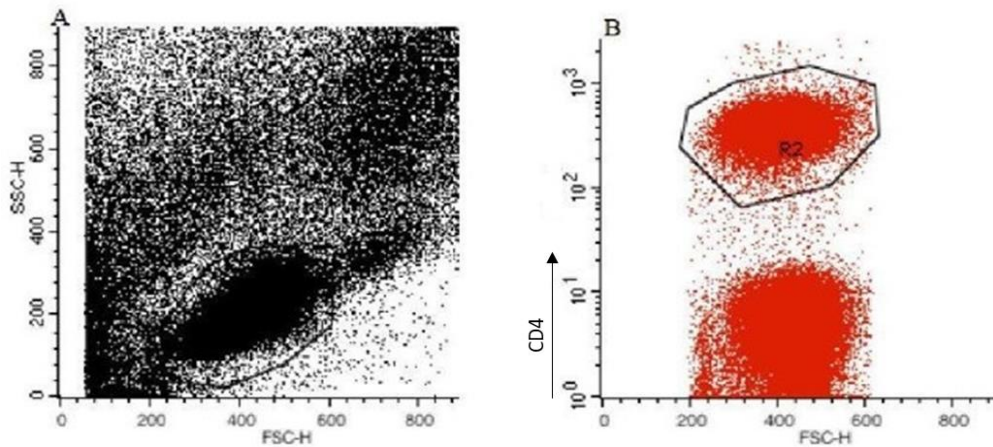


Figura 5.5 Identificazione della popolazione dei linfociti CD4+

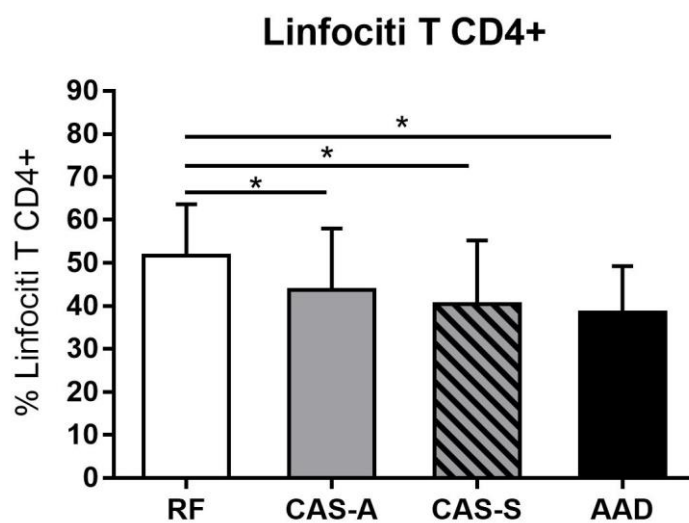


Figura 5.6 Analisi citofluorimetrica della popolazione linfocitaria T CD4+; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.1 Analisi dei linfociti T helper 17

All'interno della popolazione linfocitaria CD4 positiva sono stati analizzati i linfociti T helper 17, identificati mediante l'espressione intracellulare dell'IL-17 (**Figura 5.7**).

Abbiamo osservato che nei pazienti asintomatici CAS-A vi è un aumento dei linfociti Th17 rispetto ai CAS-S ($p < 0.05$), agli AAD ($p < 0.01$) e rispetto al gruppo di controllo degli RF ($p < 0.05$) (**Figura 5.8**). Questo potrebbe significare che il Th17 sono presenti ed attivi durante tutto il processo aterosclerotico e che in particolare aumentano nelle fasi tardive della patologia ma non sono coinvolti nell'instabilità di placca e nella dissecazione della parete arteriosa, i due eventi acuti studiati della patologia.

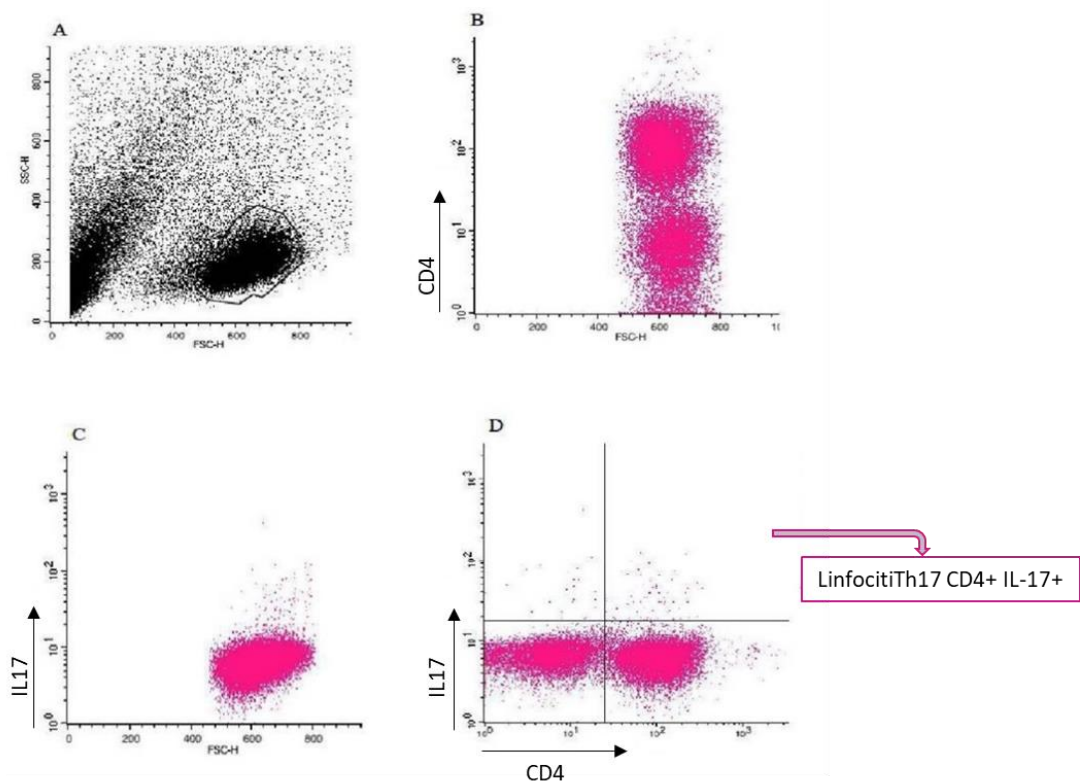


Figura 5.7 Identificazione della sottopopolazione dei linfociti T helper 17 mediante l'espressione del marker di superficie CD4 e dell'IL17 intracellulare

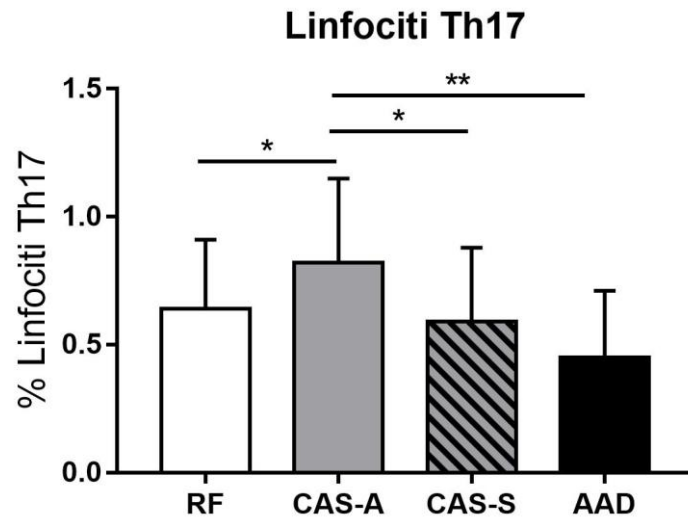


Figura 5.8 Analisi citofluorimetrica della popolazione linfocitaria T helper 17; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.2 Analisi dei linfociti T regolatori FoxP3+ e LAG3+

All'interno della popolazione linfocitaria CD4 positiva, i linfociti T regolatori classici sono stati identificati mediante l'espressione del CD25 e del FoxP3 (Treg FoxP3+) mentre la popolazione dei linfociti T regolatori LAG3+ (Treg LAG3+) stata identificata dall'espressione del marker LAG3 ed in quanto non esprime il CD25 ed il FoxP3 (**Figura 5.9**).

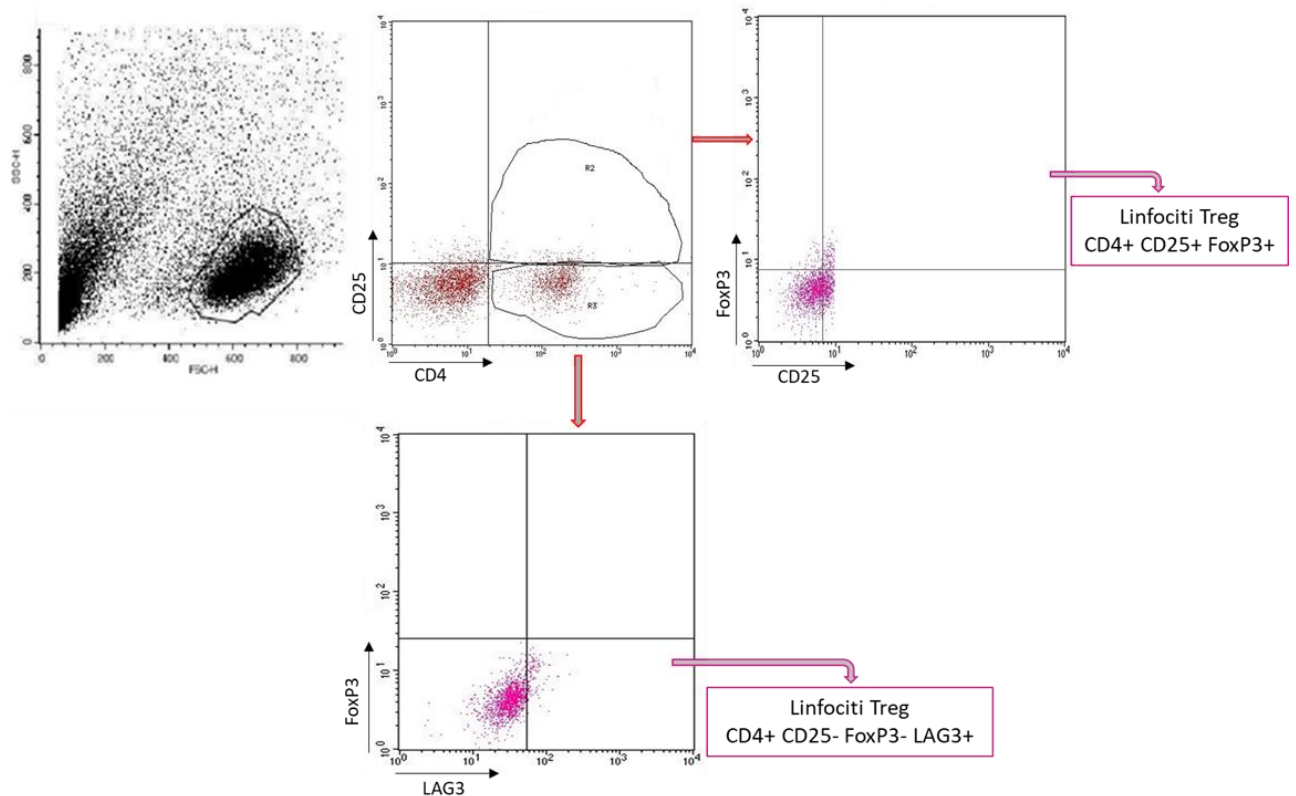


Figura 5.9 Analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni dei linfociti T regolatori mediante l'espressione dei marker CD4 CD25 e FoxP3 per i linfociti Treg classici e dei marker CD4 e LAG3 per i linfociti T reg Lag3+.

Dall'analisi dei linfociti Treg FoxP3+ abbiamo osservato un aumento significativo nei CAS-S rispetto ai CAS-A ($p < 0.05$) ed una loro diminuzione in tutti i gruppi CAS-A, CAS-S e AAD rispetto al gruppo di controllo RF che è risultata essere non statisticamente significativa (*Figura 5.10*).

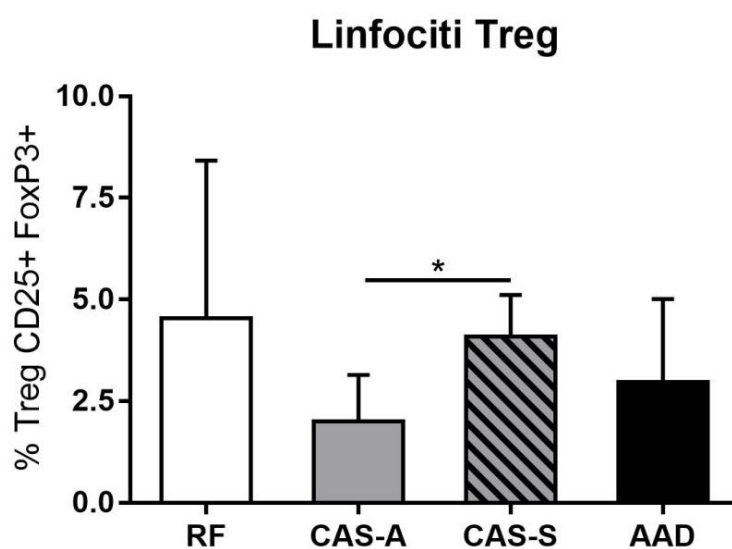


Figura 5.10 Analisi citofluorimetrica della popolazione linfocitaria T regolatoria classica FoxP3+; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Per quanto riguarda i Treg LAG3+ abbiamo osservato un andamento diverso: nei gruppi CAS-S e AAD abbiamo riscontrato una riduzione dei loro valori sia rispetto al gruppo di controllo RF che al gruppo CAS-A che è risultata essere statisticamente significativa rispetto al gruppo CAS-A (CAS-A vs CAS-S e CAS-A vs AAD $p < 0.05$) (*Figura 5.11*).

Linfociti Treg LAG3+

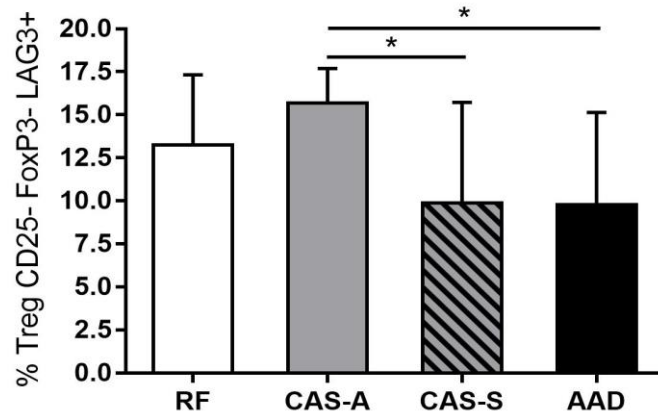


Figura 5.11 Analisi citofluorimetrica della popolazione linfocitaria T regolatoria classica FoxP3+; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Infine, il rapporto Treg LAG3+/ Treg FoxP3+ (**Figura 5.12**) aumenta nei pazienti CAS-A rispetto a tutti gli altri gruppi con una significatività statistica presente solo rispetto ai CAS-S (p<0.05). Inoltre abbiamo riscontrato un aumento, anche se non significativo, del gruppo AAD rispetto al gruppo CAS-S.

Treg LAG3+/ Treg FoxP3+

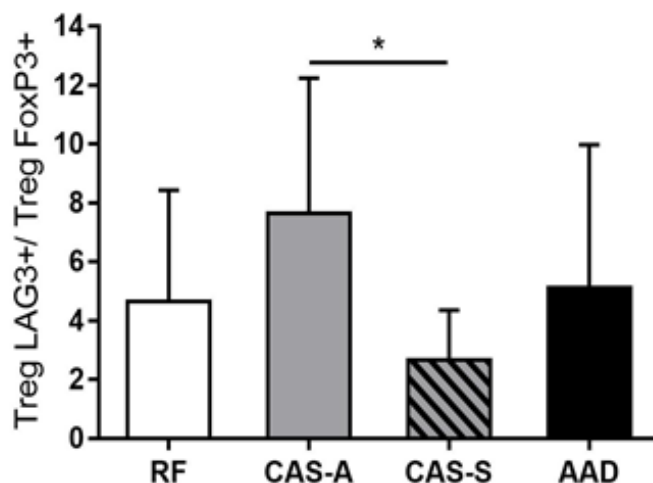


Figura 5.12 Analisi del rapporto tra la popolazione linfocitaria T regolatoria LAG3 positiva e la popolazione linfocitaria T regolatoria classica FoxP3+; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3. Analisi dei linfociti B

Le cellule sono state selezionate inizialmente in base alle caratteristiche fisiche grandezza e granulosità mediante i parametri FSC e SSC rispettivamente ed è stato disegnato un ampio gate intorno alla popolazione dei linfociti totali per escludere i monociti ed i detriti. I linfociti T, invece, sono stati esclusi attraverso l'utilizzo di un anticorpo che riconosce il CD3 espresso sulla loro superficie ed i linfociti B sono stati selezionati in base all'espressione del CD19 (*Figura 5.13*).

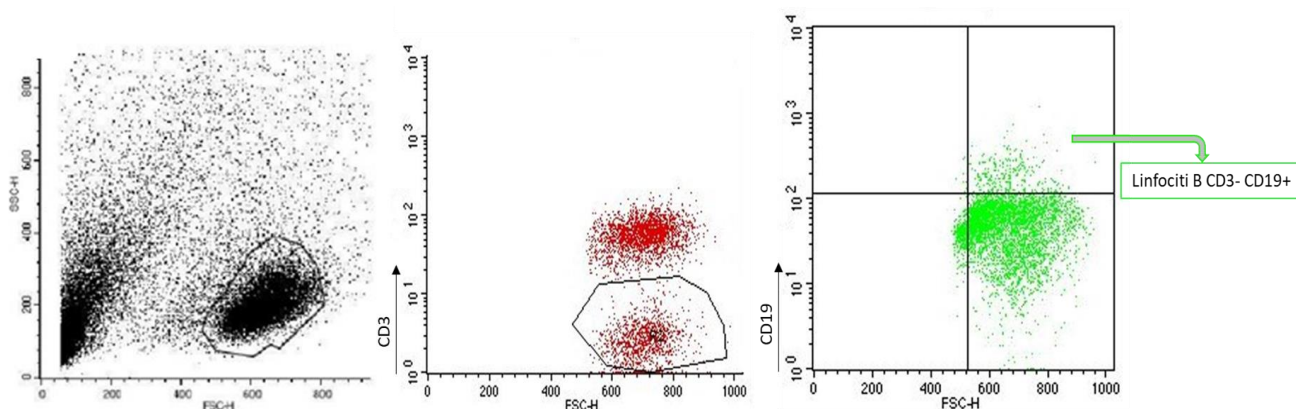


Figura 5.13 Identificazione della popolazione dei linfociti B mediante l'espressione del CD19.

Dall'analisi di questa popolazione abbiamo riscontrato un aumento nel gruppo AAD rispetto a tutti gli altri gruppi che è risultato essere statisticamente significativo rispetto al gruppo CAS-S ($p < 0.05$) che è risultato essere il gruppo con la minore espressione di linfociti B (*Figura 5.14*).

Nei pazienti con dissecazione acuta dell'aorta l'andamento delle diverse popolazioni leucocitarie risulta molto simile alla stenosi carotidea critica sintomatica mentre le due patologie si differenziano nell'espressione dei linfociti B. Inoltre in letteratura è riportato che i linfociti B svolgono un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi producendo anticorpi contro le oxLDL e le fosfolipine (Ameli S. et al. 1996), quindi anche la diminuzione dei linfociti B nei pazienti con stenosi sintomatica potrebbe favorire la rottura della placca.

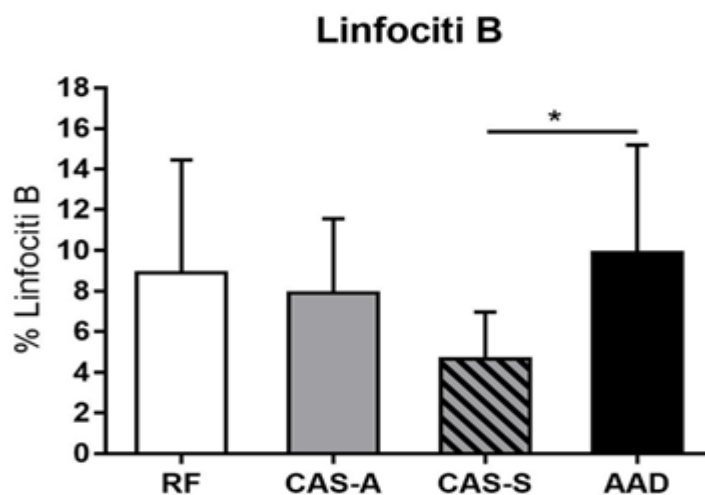


Figura 5.16 Analisi citofluorimetrica della popolazione dei linfociti B; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Parte dei risultati descritti in questo capitolo sono stati pubblicati nell'articolo "*Regulatory T CD4+CD25+ lymphocytes increase in symptomatic carotid artery stenosis*" Del Porto F, Cifani N, Proietta M, Perrotta S, Dito R, Di Gioia C, Carletti R, Rizzo L, Orgera G, Rossi M, Ferri L, Tritapepe L, Taurino M. *Annals of Medicine*, 2017 Jun;49(4):283-290 in seguito riportato.

Capitolo VI

Conclusioni

Questo studio osservazionale ha avuto come scopo quello di analizzare le popolazioni cellulari del sistema immunitario coinvolte nell'evoluzione del processo aterosclerotico, più in dettaglio di quei meccanismi infiammatori che esercitano un'azione volta alla destabilizzazione della placca o alla perdita dell'integrità parietale delle arterie di grande calibro.

Nell'ambito delle manifestazioni acute dell'aterosclerosi la nostra indagine si è soffermata sull'analisi di due patologie in particolare, la stenosi carotidea critica sintomatica (gruppo CAS-S) e la dissecazione acuta dell'aorta (gruppo AAD). La scelta è stata guidata dall'ipotesi secondo cui i due eventi acuti presi in esame, sebbene estremamente differenti tra loro, siano guidati dall'attività infiammatoria del sistema immunitario e, quindi, abbiamo voluto valutare eventuali differenze e similitudini nei meccanismi infiammatori attivati durante la loro evoluzione.

Nel nostro studio è risultato evidente il differente ruolo dell'immunità innata ed adattativa nella destabilizzazione della placca e nella dissecazione; le popolazioni leucocitarie principalmente coinvolte nella dissecazione acuta dell'aorta sono per la maggior parte costituite da cellule dell'immunità innata, in particolar modo dai monociti-macrofagi, mentre nella stenosi carotidea critica è stata riscontrata un'elevata percentuale di linfociti, tra cui la sottopopolazione maggiormente rappresentata è costituita da linfociti T CD4+.

I monociti rappresentano un reservoir di cellule mieloidi fondamentali per il rinnovamento dei macrofagi tissutali e cellule dendritiche ma sono anche in grado di svolgere attività effettrici, di presentazione dell'antigene e attività regolatorie.

Dall'analisi delle sottopopolazioni monocitarie abbiamo osservato un aumento della percentuale dei monociti classici nei pazienti con dissecazione rispetto ai pazienti con stenosi sintomatica. I monociti classici svolgono un'attività di protezione nei confronti dei patogeni e una causa di dissecazione in pazienti predisposti è la presenza di infezioni batteriche e virali. Questo risultato, quindi, conferma l'ipotesi di un contributo microbico nell'attivazione del processo infiammatorio attivato durante il rimodellamento della parete arteriosa nella dissecazione.

Non abbiamo riscontrato, invece, differenze statisticamente significative riguardo la percentuale della popolazione monocitaria non classica tra i gruppi studiati. Nonostante ciò abbiamo osservato che vi è una diminuzione della percentuale di questa popolazione sia nella stenosi che nella dissecazione rispetto al gruppo di controllo; poiché i monociti non classici svolgono un'attività di sorveglianza dei tessuti, la loro diminuzione e quindi il venir meno di questa loro attività di patrolling potrebbe essere una concausa dell'insorgenza o dell'acutizzarsi della patologia aterosclerotica.

La popolazione monocitaria intermedia risulta diminuita nei pazienti con dissecazione aortica ma non in quelli con stenosi carotidea critica. I monociti intermedi sono una popolazione con attività pro-infiammatoria e infatti dalla letteratura si evince che questi siano in grado di orientare la risposta infiammatoria verso una risposta mediata dai linfociti T CD4+. Questo quindi potrebbe spiegare perché nella dissecazione aortica i pazienti vanno incontro a linfopenia con una diminuzione spiccata della popolazione linfocitaria pro-infiammatoria a differenza invece della stenosi carotidea che è caratterizzata dall'attivazione di una risposta infiammatoria mediata principalmente dai componenti dell'immunità adattativa.

Questi dati ci hanno quindi spinti ad approfondire anche il ruolo delle popolazioni infiammatorie protagoniste della risposta adattativa con particolare attenzione al ruolo svolto dai linfociti T CD4+. Tra le popolazioni CD4 positive abbiamo soffermato la nostra attenzione sui linfociti Th17 e sui T regolatori. Dalla letteratura si evince che i linfociti Th17 svolgono un'attività pro-infiammatoria ma ci sono opinioni contrastanti riguardo il loro ruolo nel processo aterosclerotico. I linfociti T regolatori, invece, svolgono un'attività anti-infiammatoria per mezzo di meccanismi di contatto cellulare e tramite il rilascio di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e TGF- β e svolgono un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi.

Nel nostro studio abbiamo osservato che nei pazienti con stenosi carotidea asintomatica vi è un aumento dei linfociti Th17 rispetto sia ai pazienti con stenosi carotidea sintomatica sia rispetto ai pazienti con dissecazione che rispetto al gruppo di controllo. Questo potrebbe significare che i linfociti Th17 sono presenti ed attivi durante tutto il processo aterosclerotico e che in particolare aumentano nelle fasi tardive della patologia ma non sono coinvolti nell'instabilità di placca.

Per quanto riguarda i linfociti T regolatori, invece, abbiamo osservato un aumento nei pazienti con stenosi carotidea sintomatica rispetto ai pazienti con stenosi carotidea asintomatica ed una

loro diminuzione nei pazienti con stenosi carotidea asintomatica rispetto anche al gruppo di controllo. I dati ottenuti suggeriscono che questa popolazione rappresenti un pattern caratteristico di questa patologia nonostante ci aspettassimo una loro diminuzione nella patologia acuta essendo una popolazione che svolge attività anti-infiammatoria. Successivamente, infatti siamo andati a studiare in maniera più approfondita la popolazione dei linfociti T regolatori ed in particolare la nostra attenzione si è soffermata su una sottopopolazione di Treg che esprime il LAG3, un marker di membrana analogo al CD4, e che non necessita dell'espressione del FoxP3 per svolgere la propria attività regolatoria. Questa popolazione linfocitaria sta recentemente suscitando interesse in quanto è la popolazione che produce le maggiori quantità di IL-10 e TGF- β , due citochine con attività prettamente anti-infiammatoria, ed è anche in grado di svolgere la propria attività attraverso meccanismi contatto-dipendenti (Liang et al. 2008).

Abbiamo osservato che nei pazienti con stenosi asintomatica, sintomatica e nella dissecazione vi è una diminuzione dei linfociti T CD4 totali e che tra le popolazioni CD4 positive, i linfociti T regolatori FoxP3+ aumentano nei pazienti con stenosi carotidea sintomatica rispetto ai pazienti con stenosi carotidea asintomatica; al contrario, quando si verifica un'acutizzazione della patologia vi è una diminuzione dei livelli dei linfociti LAG3+ nelle due patologie sintomatiche. La riduzione significativa dei LAG3+ nei CAS-S e negli AAD è interessante vista la presenza in letteratura di studi che correlano bassi livelli di IL-10 ad un aumentato rischio di sviluppare un evento cerebrale acuto (Van Exel E et al. 2002).

Nella dissecazione acuta dell'aorta e nella stenosi carotidea critica le cellule dell'immunità adattativa hanno un andamento molto simile; ciò che differenzia queste due patologie è risultato essere l'aumento dei linfociti B nei pazienti con dissecazione rispetto ai pazienti con stenosi sintomatica. È stato osservato che esiste una stretta correlazione tra l'attivazione di una reazione infiammatoria in risposta alla presenza di agenti infettivi e l'insorgenza di placche aterosclerotiche (Gredmark-Russ S et al. 2009). In soggetti predisposti l'esposizione ad antigeni, come avviene nelle infezioni, potrebbe quindi aumentare il rischio di sviluppare patologie vascolari come la stenosi carotidea critica e la dissecazione aortica andando ad influenzare la risposta immunitaria.

Alla luce di questi dati potremmo concludere che la risposta immunitaria innata è probabilmente maggiormente coinvolta nella dissecazione aortica e che l'aumento dei

monociti classici e dei linfociti B nei pazienti AAD supporta l'ipotesi di un contributo microbico all'indebolimento della parete arteriosa ed alla conseguente dissecazione dell'aorta. L'acutizzarsi della stenosi carotidea sembrerebbe essere, invece, causata da un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro-infiammatori ed anti-infiammatori tipicamente attivati durante la risposta infiammatoria adattativa.

I linfociti pro-infiammatori T helper 17 sembrerebbero essere coinvolti nell'insorgenza e durante tutto il processo aterosclerotico ma non nella fase di destabilizzazione della placca aterosclerotica; ciò che invece potrebbe essere il responsabile dell'alterazione di questo fine equilibrio del sistema immunitario è la variazione del rapporto tra le due popolazioni T regolatorie. In particolare la stenosi carotidea critica sintomatica è caratterizzata dalla diminuzione dei linfociti T CD4+ totali, dall'aumento dei linfociti Treg classici e dalla diminuzione dei linfociti Treg LAG3+ rendendo quindi la diminuzione di quest'ultima popolazione con attività anti-infiammatoria una probabile responsabile della perdita dell'equilibrio alla base della risposta infiammatoria e quindi all'insorgenza della sintomatologia acuta. Infine, nonostante la dissecazione acuta dell'aorta e la stenosi carotidea critica siano due condizioni imputabili a due diversi componenti del sistema immunitario (immunità innata nella dissecazione e adattativa nella stenosi carotidea sintomatica) sembra che il ruolo dei linfociti T regolatori sia simile nelle due patologie acute.




Regulatory T CD4 + CD25+ lymphocytes increase in symptomatic carotid artery stenosis

Flavia Del Porto, Noemi Cifani, Maria Proietta, Sara Perrotta, Raffaele Dito, Cira di Gioia, Raffaella Carletti, Luigi Rizzo, Gianluigi Orgera, Michele Rossi, Livia Ferri, Luigi Tritapepe & Maurizio Taurino

To cite this article: Flavia Del Porto, Noemi Cifani, Maria Proietta, Sara Perrotta, Raffaele Dito, Cira di Gioia, Raffaella Carletti, Luigi Rizzo, Gianluigi Orgera, Michele Rossi, Livia Ferri, Luigi Tritapepe & Maurizio Taurino (2017) Regulatory T CD4 + CD25+ lymphocytes increase in symptomatic carotid artery stenosis, *Annals of Medicine*, 49:4, 283-290, DOI: [10.1080/07853890.2016.1241427](https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1241427)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1241427>


 View supplementary material [↗](#)

 Accepted author version posted online: 03 Oct 2016.
Published online: 08 Dec 2016.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 103


 View Crossmark data [↗](#)

 Citing articles: 2 View citing articles [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iann20>

ORIGINAL ARTICLE

Regulatory T CD4 + CD25+ lymphocytes increase in symptomatic carotid artery stenosis

Flavia Del Porto^{a,b} , Noemi Cifani^a, Maria Proietta^{a,c}, Sara Perrotta^a, Raffaele Dito^{a,d}, Ciria di Gioia^e, Raffaella Carletti^e, Luigi Rizzo^{a,d}, Gianluigi Orgera^f, Michele Rossi^f, Livia Ferri^{a,b}, Luigi Tritapepe^g and Maurizio Taurino^{a,d}

^aDipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, Facoltà di Medicina e Psicologia, “Sapienza” Università di Roma, Italy; ^bUOC Medicina 3, Ospedale Sant’Andrea, Rome, Italy; ^cUOS Aterosclerosi e Dislipidemia, Ospedale Sant’Andrea, Rome, Italy; ^dUOC Chirurgia Vascolare, Ospedale Sant’Andrea, Rome, Italy; ^eDipartimento di Scienze Radiologiche Oncologiche ed Anatomopatologiche, Facoltà di Medicina ed Odontoiatria, “Sapienza” Università di Roma, Policlinico Umberto I, Rome, Italy; ^fDipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche e Medicina Traslazionale, Facoltà di Medicina e Psicologia, “Sapienza” Università di Roma, UOC Radiagnostica, Ospedale Sant’Andrea, Rome, Italy; ^gDipartimento di Scienze Anestesiologiche, Medicina Critica e Terapia del dolore, Facoltà di Medicina ed Odontoiatria, “Sapienza” Università di Roma, Policlinico Umberto I, Rome, Italy

ABSTRACT

Background: Atherosclerosis is a multifactorial disease characterized by an immune-inflammatory remodeling of the arterial wall. Treg and Th17 subpopulations are detectable inside atherosclerotic plaque; however, their behavior in symptomatic carotid artery stenosis (CAS) is not fully elucidated. The aim of this study was to evaluate Th17 and Treg subsets and their ratio in patients affected by symptomatic and asymptomatic CAS.

Methods: 14 patients with symptomatic CAS (CAS-S group), 41 patients with asymptomatic CAS (CAS-A group), 32 subjects with traditional cardiovascular risk factors (RF group), and 10 healthy subjects (HS group) were enrolled. Th17 and Treg frequency was determined by flow cytometry and by histology and immunohistochemistry. Interleukin (IL)-10, IL-17, and metalloproteinase (MMP)-12 levels were measured by ELISA.

Results: Th17 were significantly increased in CAS-A versus RF and versus HS. Tregs were significantly increased in CAS-S versus CAS-A. Tregs/Th17 ratio was significantly reduced in CAS-A versus RF and versus HS, whereas it was significantly increased in CAS-S versus CAS-A.

Conclusions: The results of this study suggest that Th17 are related to the late stages of CAS but not to plaque instability. Moreover, Treg expansion seems to represent a specific cellular pattern displayed by patients with symptomatic CAS and associated with brain injury.

KEY MESSAGES

- Tregs expansion seems to represent a specific cellular pattern displayed by patients with symptomatic CAS and associated with CD4+ effector depletion and brain ischemic injury.
- Th17 lymphocytes are related to the late stages of CAS but not to plaque instability.

ARTICLE HISTORY

Received 23 July 2016
Revised 14 September 2016
Accepted 22 September 2016
Published online 28 November 2016


KEYWORDS


Carotid atherosclerosis;
T lymphocyte subpopulations;
cytokines; MMP-12

Introduction

Atherosclerosis (ATS) is a multifactorial disease characterized by an immune-inflammatory remodeling of the arterial wall, which leads to plaque formation and lumen occlusion (1,2). Athero-occlusive diseases include a wide spectrum of lesions, which range from lipid *stria* to complicated plaque (3). T CD4+ lymphocytes represent the main immune subpopulation managing plaque progression (1,2). CD4+ cells include T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17), and regulatory T CD4+CD25+/FoxP3+ (Tregs) cells, which differ

in their functions and products (4). Depending on their own activities, the different T CD4+ subsets differently influence outcome of intra-parietal inflammation. Th1 and Th17 lymphocytes represent pro-inflammatory subpopulations and exert pro-atherogenic activities (1,5), whereas Tregs display anti-inflammatory and anti-atherogenic functions (6). The presence of some cytokines, such as fibroblast growth factor (FGF)-23, transforming growth factor (TGF)- β , and tumor necrosis factor (TNF)- α within atherosclerotic lesions of the internal carotid artery, may accelerate the development

CONTACT Flavia Del Porto  flavia.delporto@uniroma1.it  Dipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, Facoltà di Medicina e Psicologia, “Sapienza” Università di Roma, Azienda Ospedaliera Sant’Andrea, Via di Grottarossa 1035-1039, 00189 Rome, Italy

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

of plaque and its destabilization (7). In addition, Treg and Th17 subpopulations are detectable inside atherosclerotic plaque (8), although their behavior in symptomatic carotid artery stenosis (CAS) is still controversial (9). The aim of this study was, therefore, to evaluate the CD4+T subpopulations, including Th17 and Treg subsets and their ratio, in patients affected by CAS with a specific regard to symptomatic CAS (10).

Methods

The present was an observational study.

Study population

The population included in this study was composed of 59 patients with critical CAS selected in a period ranging from May 2013 to May 2015 among those undergoing to carotid thrombo-endo-arteriectomy (TEA) (11) at the Department of Vascular Surgery, Sant'Andrea Hospital, "Sapienza" University of Rome. Patients were selected from about 200 subjects on the basis of the following inclusion criteria: (i) critical carotid stenosis, defined as a narrowing of the carotid lumen $\geq 70\%$ (11); (ii) no cardiac causes of stroke; (iii) no history of neoplasm, autoimmune or inflammatory systemic diseases; (iv) no familiar or personal history of aneurysms/dissection. All patients underwent to physical and neurological examinations, carotid artery ultrasound and angiography by magnetic resonance imaging (MRI) or contrast tomography (CT). Brain CT scan or MRI were also performed.

Thirty-two patients with traditional cardiovascular risk factors, matched for age and sex, attending to the Department of Atherosclerosis and Dyslipidemia, Sant'Andrea Hospital, "Sapienza" University of Rome were selected as control group (RF group). Patients were enrolled on the basis of the following criteria: (i) no acute cerebro-vascular symptoms or history of cardiovascular disease; (ii) no carotid stenosis $>20\%$; (iii) no familiar or personal history of aneurysms/dissection. Physical and neurological examinations and carotid artery ultrasound were performed in all the controls.

Ten healthy subjects (HS group), matched for age and sex, were considered as further control.

Based on neurological symptoms and brain imaging, CAS patients were further divided into 2 subgroups: (a) Group CAS-S (symptomatic CAS) and (b) Group CAS-A (asymptomatic CAS).

Group CAS-S was originally composed by 18 patients with evidence of cerebro-vascular symptoms such as stroke or transient ischemic attack (TIA) (10). Among

them, 14 patients were selected, on the basis of the following exclusion criteria: (i) doubtful neurological symptoms; (ii) negative brain imaging; (iii) symptoms onset >1 month. All patients were included in the study in a period ranging from 2 weeks to 1 month from the onset of neurological symptoms; blood and tissue samples were collected at time of surgery.

Group CAS-A (asymptomatic CAS) included 41 patients who did not experienced any neurological symptoms within the previous 6 months and their brain MRI was consistent with the diagnosis of chronic cerebrovascular disease.

A venous blood sample was withdrawn from each patient (just before surgery) and from each control, in order to evaluate T CD4+, CD4+CD25+/FoxP3+, T helper 17 lymphocyte subpopulations. Interleukin (IL)-10, IL-17, and metalloproteinase (MMP)-12 serum levels were also assessed in all the groups. Carotid specimens were collected from all CAS patients and submitted to histological and immunohistochemical analysis.

The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine. Written informed consent was obtained from each patient or from an authorized family member.

Blood samples and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation

Blood samples were collected in tubes containing 0.2 ml sodium heparin and PBMCs were isolated by density gradient centrifugation (Lympholyte[®], Cedarlane, Hornby, CA). For Th17 cell functional analysis, PBMCs were suspended at a density of 2×10^6 cells/ml in RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM glutamine, and 10% heat-inactivated FCS. Cell suspensions were transferred to wells of 24-well plates and stimulated with 50 ng/ml of phorbolmyristate acetate (PMA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) plus 1 M ionomycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in the presence of 500 ng/ml of monensin (BD Biosciences, San Jose, CA). Cells were incubated for 4 h at 37 °C with 5% CO₂. The cells were then washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed by flow cytometry.

Serum was obtained after centrifugation and stored at -80 °C.

Flow cytometry analysis

Cells were incubated at 4 °C for 20 min with APC-conjugated anti-human CD4 (Miltenyi Biotec, Bergisch

Gladbach, Germany). After surface staining, Th17 and Treg cells were identified as follows. To detect Th17 cells, cells were fixed and permeabilized by Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions and incubated with PE-conjugated antihuman IL-17A (BD Biosciences). To detect Treg cells, cells were incubated with FITC-conjugated anti-human CD25 (BD Biosciences), fixed and permeabilized by Human FoxP3 buffer set (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions and incubated with PE-conjugated anti-human FoxP3 (BD Biosciences). After washing with PBS, stained cells were resuspended and analyzed with a FACS Calibur cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with Cell Quest software. Isotype controls were used as compensation controls and to confirm antibody specificity.

Serum IL-17, IL-10, and MMP-12 levels

Serum IL-17, IL-10, and MMP-12 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kits (IL-6, IL-8, Abcam, Cambridge, UK; MMP-12, Cusabio Biotech Co, Ltd., Wuhan, China) according to the manufacturer's instructions.

Histological evaluation and immunohistochemistry (IHC)

Fifty-five carotid specimens were fixed with 10% formalin immediately after surgery. Each arterial wall was decalcified overnight with EDTA solution and, then, serially sectioned transversely, at about 0.5 cm intervals. The specimens were processed by usual histological technique and stained with hematoxylin-eosin (H&E) for morphological evaluation.

For immunohistochemical study, consecutive histological sections (3 μ m) were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded alcohol series. Endogenous peroxidase activity was blocked by 3% hydrogen peroxide. The sections were treated with microwave (pH 6 citrate buffer). The sections were then incubated with primary antibodies: anti-CD3 (1:100, mouse monoclonal antibody, Novocastra, Leica Biosystem, Newcastle, UK, NCL-CD3-PS1), anti-CD4 (1:60, mouse monoclonal antibody, Novocastra, NCL-L-CD4-1F6), anti-CD8 (1:100, mouse monoclonal antibody, Novocastra, NCL-CD8-295), anti-CD20 (1:250, mouse monoclonal antibody, Novocastra, NCL-L-CD20-L26), and anti-CD68 (1:100, mouse monoclonal antibody, Novocastra, NCL-L-CD68), for all of them incubation at room temperature for 1 h; anti-IL-2R α /CD 25 (1:50,

mouse monoclonal antibody, Thermo Scientific, Rockford, IL, code 4C9); anti-FoxP3 (1:30, mouse monoclonal antibody, Thermo Scientific, code 450), and anti-IL17 (1:100, rabbit polyclonal antibody, Abcam, AB79056), for all of them incubation at 4 °C overnight. The reaction was amplified with LSAB2 + System-HRP (Dako, Carpinteria, CA). A positive immunoreaction was identified after incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstaining with Mayer hematoxylin. Negative controls were obtained omitting the primary antibody. Two independent investigators analyzed the immunostaining with a Leica microscope (Leitz Camera, Wetzlar, Germany), by evaluating the presence (number) of positive cells in total arterios wall section with a semiquantitative scoring system (0 = negative, 1 = 1–5 positive cells, 2 = 6–10 positive cells, 3 = >10 positive cells).

Statistical analysis

The results were expressed as median and mean \pm SD. The non-parametric Mann-Whitney *U* test and the Chi-square test were used to perform the statistical analysis; *p* value <.05 was considered significant. All the statistical procedures were performed by GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Results

Demographic and baseline characteristics

Demographic and baseline characteristics of patients included in the study are reported in [Table 1](#).

CAS-S, CAS-A, and RF

No significant differences regarding age, sex, diabetes, hypertension, dyslipidemia, and body mass index (BMI) were observed among the groups CAS-A, CAS-S, and RF, whereas the percentage of current smokers was significantly higher in CAS-S group in comparison with RF ([Table 1](#)).

All diabetic patients were taking oral blood glucose lowering drugs and/or subcutaneous insulin, as well as all hypertensive patients were under treatment with ace inhibitors or sartanic, together or not calcium antagonists or beta blockers or diuretics.

Twenty out of 32 (81.25%) RF patients were for a long time treated by statins, whereas 35/41 (85.36%) of CAS-A and 3/14 (31.42%) of CAS-S were treated as well. LDL values >100 (mg/dl) were observed in 9/32 (28.13%) of RF patients, 17/41 (41.46%) of CAS-A, and 11/14 (78.57%) of CAS-S ([Table 1](#)).

Table 1. Demographic and baseline characteristics of patients included in CAS-S, CAS-C, RF, and HS.

	Group CAS-A n = 41	M	Group CAS-S n = 14	M	Group RF n = 32	M	Group HD n = 10	M
Age (years)	68.56 ± 6.62	68.5	67.25 ± 13.	67	61.26 ± 7.45	60	66.86 ± 16.87	71
Female sex (%)	11/41 (26.8%)		3/14 (21.4)		12/32 (34.37%)		3/10 (30%)	
Diabetes	16/41 (39.02%)		4/14 (28.57%)		9/32 (28.12%)		–	
Dyslipidemia	31/41 (75.06%)		13/14 (92.85%)		26/32 (81.25%)		–	
Hypertension	37/41 (90.24%)		10/14 (71.42%)		24/32 (75.00%)		–	
Smoke*	19/41 (46.34%)		10/14 (71.42%)		12/32 (37.50%)		–	
BMI (n)	24.71 ± 2.27	24.47	24.74 ± 2.73	24.7	25.60 ± 1.92	25	–	–

*CAS-S versus RF, $p = .0340$.

BMI: body mass index.

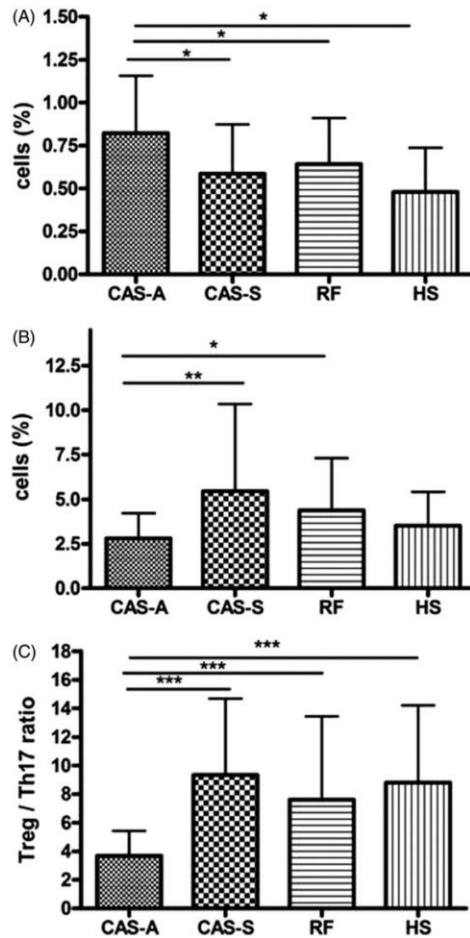


Figure 1. Th17 and Treg cells in CAS-A, CAS-S, RF, and HS groups. (A) Percentage of Th17 cells; (B) Percentage of Treg cells; (C) Treg/Th17 ratio. Data are expressed as median and mean ± SD. Statistical analysis: non-parametric Mann-Whitney *U* test. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

Lymphocyte subpopulations

Fifty-three out of 55 CAS patients were included in statistics. One patient, indeed, showed a very low T

lymphocyte response and was excluded from statistical analysis and in one no PBMCs were collected.

CAS-S, CAS-A, RF, and HS

A progressive and significantly increase of Th17 was observed in CAS-A versus RF ($p = .0179$) and versus HS ($p = .038$), whereas they were significantly reduced in CAS-S versus CAS-A ($p = .0291$) (Figure 1(A)). Tregs were significantly increased in CAS-S versus CAS-A ($p = .0097$), whereas they were significantly reduced in CAS-A versus RF ($p = .0003$) and versus HS ($p < 0.0001$), whereas it was significantly increased in CAS-S versus CAS-A ($p < 0.0001$). A significant reduction of total CD4+ lymphocytes was observed in both CAS-A ($p = .0201$) and CAS-S ($p = .0196$) in comparison with RF, with a significant increase of Th17/CD4+ ratio in CAS-A versus RF ($p = .007$) and HS ($p = .0012$) an almost significant increase of Tregs/CD4+ ratio in CAS-S versus CAS-A ($p = .0599$) (see Tables 2 and 3).

IL-17, IL-10, and MMP-12

No significant difference regarding IL-10 and IL-17 levels was found among the groups, whereas a significant higher value of MMP-12 in CAS-A versus RF ($p = .0262$) was observed (see Table 4).

Histological evaluation

All carotid artery specimens collected were suitable for immunohistochemistry (Figure 2).

Immune infiltrate

Twelve out of 14 (85.71%) samples collected from CAS-S group patients showed inflammation and/or complications, whereas only 23 out of 41 (56.97%)

Table 2. Results obtained from comparison of T CD4+ lymphocyte subpopulation among CAS divided into symptomatic and asymptomatic patients, RF and HS.

Group	TCD4+		Tregs		Th17		Tregs/Th17		Tregs/CD4+		Th17/CD4+	
	Mean ± SD	M	Mean ± SD	M	Mean ± SD	M	Mean ± SD	M	Mean ± SD	M	Mean ± SD	M
CAS-S	40.46 ± 14.78	41.29	5.45 ± 4.89	3.96	0.59 ± 0.29	0.51	9.33 ± 5.35	7.52	0.183 ± 0.27	0.102	0.016 ± 0.011	0.012
CAS-A	43.71 ± 14.30	44.94	2.81 ± 1.41	2.62	0.82 ± 0.33	0.78	3.69 ± 1.73	3.43	0.072 ± 0.041	0.062	0.021 ± 0.011	0.019
RF	51.68 ± 11.93	52.61	4.38 ± 2.92	4.11	0.64 ± 0.27	0.60	7.60 ± 5.83	5.54	0.096 ± 0.08	0.073	0.013 ± 0.01	0.012
HS	46.57 ± 7.95	48.33	3.52 ± 1.90	3.09	0.48 ± 0.26	0.48	8.80 ± 5.42	6.25	0.08 ± 0.057	0.069	0.01 ± 0.01	0.01

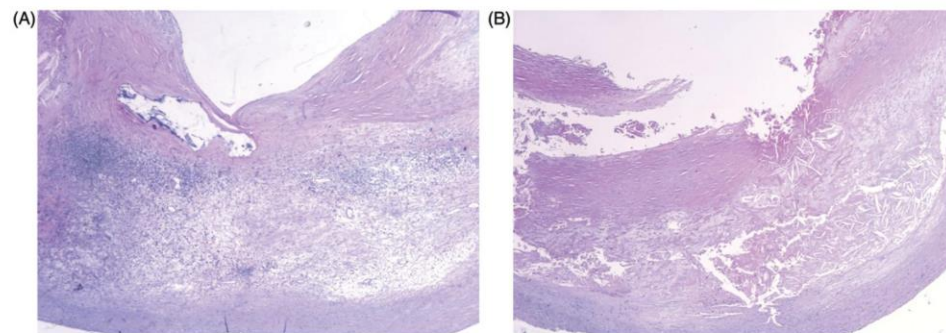
Table 3. Statistical analysis of results reported in Table 4.

	TCD4+	T regs	Th17	Tregs/Th17	Tregs/CD4+	Th17/CD4+
	p	p	p	p	p	p
Group CAS-A versus CAS-S	.4506	.0097*	.0291*	<.0001*	.0599	.11
Group CAS-A versus RF	.0201*	.0174*	.0179*	.0003*	.5353	.007*
Group CAS-A versus HS	.610	.2309*	.038*	<.0001*	.8588	.0012*
Group CAS-S versus RF	.0196*	.6246	.5115	.0924	.2421	.7856
Group CAS-S versus HS	.1986	.2536	.364	.3062	.4025	.3062
Group RF versus HS	.1717	.5352	.0982	.3226	.8849	.182

*Significant p values.

Table 4. Results obtained from measurement of IL-10, IL-17, and MMP-12 in the different groups and statistical analysis of results.

Group	IL-17		IL-10		MMP-12		Statistical analysis			
	Mean ± SD	M	Mean ± SD	M	Mean ± SD	M	Groups	p	p	p
CAS-S (n = 7)	11.81 ± 5.49	10.59	12.79 ± 4.12	13.31	9.44 ± 4.44	7.92	CAS-A versus CAS-S	.2655	1	.7950
CAS-A (n = 24)	9.61 ± 5.88	9.05	13.82 ± 9.13	11.10	8.92 ± 4.60	7.90	CAS-A versus RF	.5364	.91	.0262
RF (n = 23)	8.29 ± 3.21	9.18	13.13 ± 7.69	11.92	6.04 ± 2.85	5.56	CAS-S versus RF	.1608	.42	.0991

**Figure 2.** Representative microscopic images of carotid atherosclerotic plaque, calcified and inflamed (A) and complicated by ulceration of fibrous cap and superficial deposition of fibrinous material (B). Hematoxylin–eosin, original magnification 2.5×.

CAS-A patient samples showed inflammation and complications ($p = .0467$) (Figure 3).

In all, 12 CAS-S samples with evidence of inflammation, macrophages and T CD3+ lymphocytes were found, whereas B lymphocytes were detectable only in 8/12 (66.67%) of them.

In all, 23 CAS-A samples showing an immune infiltrate, macrophages and T lymphocytes were detectable, whereas B lymphocytes were found only in 15/23 (65.21%) samples.

T helper 17 lymphocytes were positive in all 12/12 inflamed CAS-S samples (100%), whereas Th17 were positive in 17/23 (73.91%) of inflamed CAS-A samples ($p = .052$).

Tregs were present in 9/12 (75.00%) of CAS-S samples, whereas 16/23 (69.56%) were positive among CAS-A patients ($p = .73$) (see Tables S1 and S2 presented as supplementary materials).

Discussion

The results of the present study demonstrate that T helper 17 subset progressively increases in advanced stages of CAS, underlying to a progressive and significant reduction of Tregs/Th17 ratio, whereas Th17 subpopulation do not raise in symptomatic CAS. In agreement with the literature, this evidence seems to

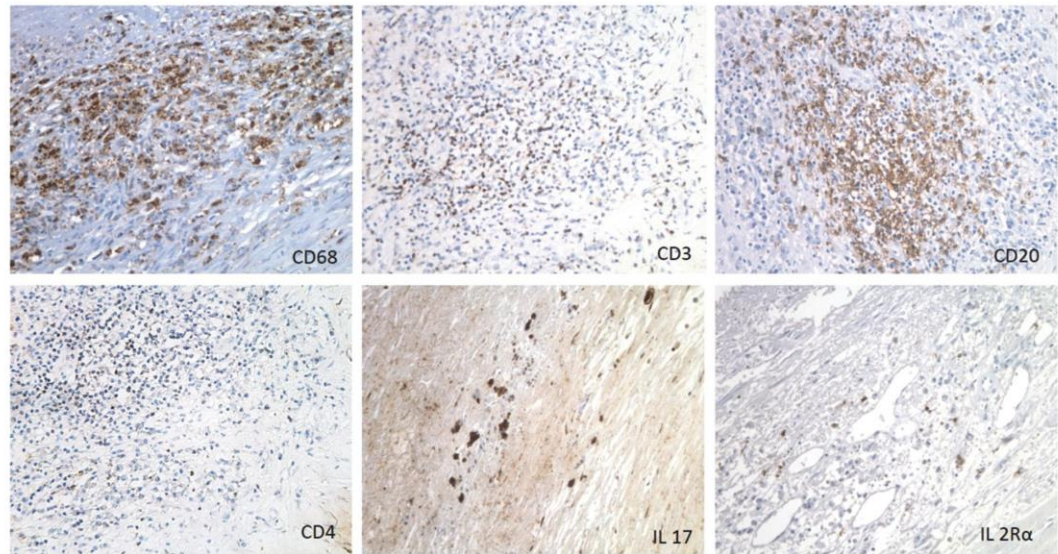


Figure 3. Representative microscopic images of immunohistochemical characterization of intraplaque inflammatory infiltrate: CD68 macrophages; CD3-T lymphocytes; CD20-B lymphocytes; CD4-T helper lymphocytes; IL-17; IL-2R α (original magnification 20 \times).

confirm that Th17 expansion is related to ATS progression but not to plaque instability.

Th17 represents a pro-inflammatory lymphocyte subpopulation, which has been involved in the pathogenesis of many systemic diseases, including ATS (12). Th17 lymphocytes are detectable inside carotid plaque and several evidences suggest that they are related to plaque expansion (8,13), however, it is still unclear whether such subpopulation can affect plaque stability (5,9). It has been demonstrated that Th17 promote plaque formation by releasing IL-17, which in turn is able to induce endothelial cell apoptosis, to recruit monocytes and neutrophils, to favor platelet adhesion, and to promote pro-inflammatory cytokine and MMP release (9,14,15). An expansion of Th17 subsets has been demonstrated in patients affected by CAS (13) and by ischemic heart diseases (16); however, a certain relationship between Th17 subset and symptomatic ATS has not been recognized (17,18). On the contrary, Taleb et al. reported that high levels of IL-17 were associated with a lower risk of mortality and recurrent myocardial infarction, suggesting even a protective effect of Th17 cells against symptomatic ATS. It has been hypothesized that IL-17 release exerts its beneficial actions by inhibiting lymphocyte recruitment and by favoring fibrous cap thickening (19,20). Based on such controversial evidences, many authors hypothesized that Th17 cells were mainly involved in late stage of atherosclerotic lesion development, rather than in plaque destabilization. In agreement, results of

the present study demonstrated that Th17 subpopulation is not related to symptomatic CAS. Such evidence can also partly explain the lack of significance found in circulating IL-17 levels among the groups. This cytokine, indeed, was measured in all patients with critical CAS. Moreover, IL-17 was also measurable in RF patients and it is conceivable that traditional cardiovascular risk factors can promote the establishment of such pro-inflammatory environment, which in turn is able to induce Th17 differentiation (5,21).

Consistently with results obtained from peripheral blood, immunohistochemistry analysis did not reveal significant differences in intra-plaque Th17 expression between CAS-S and CAS-A, whereas, in agreement with the literature, complicated and inflamed plaques were significantly more represented in CAS-S group versus CAS-A, confirming that inflammation is responsible of plaque complications.

A very interesting result derives from Tregs, which seem to identify, among CAS patients, those with symptomatic disease. The role of T lymphocyte subpopulations in brain ischemic injury represents a challenge, which is still under evaluation. Brain damage derives from the interaction between innate and adaptive immunity (22). Macrophages and neutrophils infiltrate brain early after injury, whereas T lymphocytes supervene over 24h, reaching their peak around 3 days after stroke (21). A second recruitment of T lymphocytes occurs in a period ranging from 14 to 30 days after stroke, mainly constituted by Tregs (23).

Despite immune cells diffusely infiltrate ischemic brain tissue, their specific functions are not completely understood (24,25).

In agreement with the literature, a significant increase of peripheral Tregs was found in CAS-S patients, who were enrolled during a period ranging from 2 weeks to 1 month from the onset of acute neurological symptoms. Moreover, CAS patients both symptomatic and asymptomatic showed a significant reduction of total CD4+lymphocytes in comparison with RF subjects, suggesting that CD4+lymphocyte depletion occurs in late stages of carotid ATS. However, in CAS-S, Tregs represented the main TCD4+ population. Stroke, indeed, is related to an immune-depressive state with a prevalent innate response (26). In such contest, it is conceivable that Tregs can attenuate brain inflammation by lowering activities of CD4+ effector cells (27–29), especially considering that in symptomatic CAS Tregs represented the main subpopulation CD4+. Several evidences, indeed, demonstrated that CD4+ induces neuronal death. On the other hand, post-ischemic inflammation of the brain, beyond its harmful effect presents a beneficial result by promoting tissue repair. The role of Tregs in such context is doubtful, since they have been associated both with protective and worsening effects on cerebral tissue damage (30,31). Actually, current opinion has not reached a consensus about Tregs detrimental or beneficial effect on ischemic stroke (29). Such discordance can partly be attributed to patient selection. It should be considered, indeed, that in most of the studies ischemic stroke was globally considered, including patients with cardio-embolism, CAS and intracerebral vessel occlusion. Moreover, it has been described an alternative CD4+CD25+ natural Treg subpopulation which does not exert regulatory functions, but plays a pivotal role promoting brain inflammation by affecting microvascular function and by favoring platelet aggregation. The existence of an alternative CD4+CD25+ subpopulation is very attractive and can in part explain the lack of significance of IL-10 levels among the groups evaluated in the present study (32,33). Furthermore, it is well known that Tregs perform their inhibitory functions mainly by a direct cell to cell contact, not related to IL-10 release. The evidence that immunohistochemistry did not demonstrate a significant difference in intra-plaque Treg expression between CAS-S and CAS-A is not surprising, since it is conceivable that regulatory cells are related to brain damage and not to plaque instability. The results of the present study, therefore, suggest that Tregs increase is related to CD4+ effector depletion, and can be considered a hallmark of symptomatic CAS.

Considering the depletion of CD4+ cells, the increase of regulatory T cells and the high positivity for CD68 at immunohistochemistry, it was conceivable that macrophages act as key mediators of plaque instability. With this aim, MMP-12 levels were evaluated. This enzyme, indeed, is exclusively released by macrophages and can be considered a specific marker of their activation. The results of this analysis demonstrated that MMP-12 levels were higher in CAS both A and S, but there was no difference between the two groups. So that a specific activation of macrophages in symptomatic CAS fails to be demonstrated. Therefore, in agreement with the literature we can comment that MMP-12 is related to carotid plaque progression but not to brain injury (34,35).

Taken as a whole, the results of the present study seem of particular interest since CAS-S patients displayed a peculiar T CD4+ cell array. Considering that this study was based on very restrictive inclusion criteria, aimed to identify only stroke becoming from CAS, it is possible to conclude that Tregs expansion seems to represent a specific cellular pattern displayed by patients with symptomatic CAS and associated with CD4+ effector depletion and brain ischemic injury. Moreover, the results presented here confirm that Th17 are related to late stages of CAS but not to plaque instability.

Disclosure statement

The authors have no actual or potential conflict of interest to declare, including any financial, personal, or other relationships with other people or organizations within 3 years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Funding

This study was funded by the Università di Roma “La Sapienza”, Progetto di Ricerca di Università [grant No. C26A13SKK2].

ORCID

Flavia Del Porto  <http://orcid.org/0000-0001-9041-3543>

References

1. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685–95.
2. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610–21.

3. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced type of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355–74.
4. Aukrust P, Otterdal K, Yndestad A, Sandberg WJ, Smith C, Ueland T, et al. The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2008;10:236–43.
5. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:258–64.
6. Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, et al. Role of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:893–900.
7. Janczak D, Ziolkowski P, Garcarek J, Janczak D Jr, Dorobisz K, Chabowski M. The cytokines within the carotid plaque in symptomatic patients with internal carotid artery stenosis. *J Cardiothorac Surg*. 2014;9:9060.
8. Oliveira RT, Silva RM, Teo FH, Mineiro MF, Ferreira MC, Altamiani A, et al. Detection of TCD4+ subsets in human carotid atheroma. *Cytokine*. 2013;62:131–40.
9. Gong F, Liu Z, Liu J, Zhou P, Liu Y, Lu X. The paradoxical role of IL-17 in atherosclerosis. *Cell Immunol*. 2015;297:33–9.
10. Kidwell CS, Warach S. Acute ischemic cerebrovascular syndrome: diagnostic criteria. *Stroke*. 2003;34:2995–8.
11. Raman G, Moorthy D, Hadar N, Dahabreh IJ, O'Donnell TF, Thaler DE, et al. Management strategies for asymptomatic carotid stenosis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2013;158:676–85.
12. Waisman A, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol*. 2015;129:625–37.
13. Liu ZD, Wang L, Lu FH, Pan H, Zhao YX, Wang SJ, et al. Increased Th17 cell frequency concomitant with decreased Foxp3+ Treg cell frequency in the peripheral circulation of patients with carotid artery plaques. *Inflamm Res*. 2012;61:1155–65.
14. Smith E, Prasad KM, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K, et al. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2010;121:1746–55.
15. Hot A, Lenief V, Mussec P. Combination of IL 17 and TNF-alpha induces a proinflammatory, procoagulant and prothrombotic phenotype in human endothelial cells. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:768–76.
16. Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2008; 127:89–97.
17. Simon T, Taleb S, Danchin N, Laurans L, Rousseau B, Cattani S, et al. Circulating levels of IL-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012;34:570–7.
18. Hu y, Zheng Y, Wu Y, Bing N, Shi S. Imbalance between IL-17A-producing cells and regulatory T cells during ischemic stroke. *Mediat Inflamm*. 2014;Article ID 813045.
19. Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, Ohta D, Ito K, Kanayama M, et al. Interleukin 17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:273–80.
20. Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, et al. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med*. 2009;206:2067–77.
21. Marks BR, Nowyhed HN, Choi JY, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA, et al. Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10:1125–32.
22. Jickling GC, Zhan X, Stamova B, Ander BP, Tian Y, Liu D, et al. Ischemic transient neurological events identified by immune response to cerebral ischemia. *Stroke*. 2012;43:1006–12.
23. Stubbe T, Ebner F, Richter D, Engel O, Klehmet J, Rojl G, et al. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:37–47.
24. Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*. 2006;113:2105–12.
25. Becker KJ. Sensitization and tolerization to brain antigens in stroke. *Neuroscience*. 2009;158:1090–7.
26. Gu L, Jian Z, Stary C, Xiong X. T cells and cerebral ischemic stroke. *Neurochem Res*. 2015;40:1786–91.
27. Xu X, Li M. J. The paradox role of regulatory T cells in ischemic stroke. *ScientificWorldJournal*. 2013;Article ID 174373.
28. Hu X, Li P, Chen J. Pro: regulatory T cells are protective in ischemic stroke. *Stroke*. 2013;44:e85–6.
29. Kleinschnitz C, Wiendl H. Con: regulatory T cells are protective in ischemic stroke. *Stroke*. 2013;44:e87–8.
30. Li P, Mao L, Liu X, Gan Y, Zheng J, Thomson AW, et al. Essential role of program death 1-ligand 1 in regulatory T-cell-afforded protection against blood-brain barrier damage after stroke. *Stroke*. 2014; 45:857–64.
31. Kleinschnitz C, Kraft P, Dreykluft A, Hagedorn I, Göbel K, Schuhmann MK, et al. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*. 2013;121:679–91.
32. Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. CD4+FoxP3 regulatory-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis*. 2011;26:87–90.
33. Gu L, Xiong X, Zhang H, Xu B, Steinberg GK, Zhao H. Distinctive effects of T cell subsets in neuronal injury induced by cocultured splenocytes in vitro and by in vivo stroke in mice. *Stroke*. 2012;43:1941–6.
34. Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, Fan J, Shimajiri S, Kitajima S, et al. Matrix metalloproteinase 12 accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol*. 2008;172:1419–29.
35. Yang Y, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res*. 2015; 1623:30–8.

Bibliografia

- ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., PILLAI S.; *Immunologia cellulare e molecolare*. Sesta edizione. Elsevier Masson Srl. 2008.
- AIT-OUFELLA H. et al. *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice*. *Nat. Med.* (2006). 12, 178–180
- AMELI S. et al. *Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1996) 16, 1074–1079
- BAECHER-ALLAN CLARE et al. *CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood*. *Journal of Immunology* (2001); 167:1245-1253.
- BETTELLI E et al. *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature* (2006), 441, 235–238.
- BINDER C.J. et al. *IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis*. *J. Clin. Invest.* (2004) 114, 427–437.
- BOCHKOV V.N. et al. *Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca⁺⁺/NFAT*. *Blood* (2002) 99, 199–206.
- BROWNLEE M. *Negative consequences of glycation*. *Metabolism* (2000); 49:9-13.
- BUONO C. et al. *Influence of interferon-g on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2003)23, 454–460.

- BUONO C. et al. *T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005)102, 1596–1601.
- BURIONI R et al. *Antigen-driven evolution of B lymphocytes in coronary atherosclerotic plaques*. J Immunol (2009); 183(4): 2537-2544
- BUSINARO RITA. *Neuroimmunology of the atherosclerotic plaque: a morphological approach*. Journal of Neuroimmune Pharmacology (2013) 8:15-27.
- BUSINARO R. et al. *Heat-shock protein 90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis*. Atherosclerosis (2009) 207:74-83.
- CALIGIURI G. et al. *Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice*. J. Clin. Invest. (2002) 109, 745–753.
- COLLINSA ROBERT G. et al. *P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (Icam)-1 Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice*. J Exp Med. (2000) Jan 3;191(1):189-94.
- CHENG JM et al. *Relation of C-Reactive Protein to coronary plaque characteristics on grayscale, radiofrequency intravascular ultrasound, and cardiovascular outcome in patients with acute coronary syndrome or stable Angina Pectoris (from the ATHEROREMO-IVUS Study) 2014*. American Journal of Cardiology (2014); DOI:10.1016/j.amjcard.2014.08.013.
- CHENG X. et al. *Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit atherosclerosis in ApoE(-/-) mice through modulation of Th1/Th2 balance*. J Mol Cell Cardiol. (2008); 45:168-75.
- CRETNEY E et al. *The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells*. (2011) Nat Immunol 12:304–311

- CUROTTO DE LAFAILLE MARIA A. AND JUAN J. LAFAILLE. *Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity (2009); 30:626-635.
- DE BOER OJ et al. *Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions.* PLoS One (2007); 2(8):e779.
- DEBAKEY ME et al. *Surgical management of dissecting aneurysms of the aorta* J. Thorac. Cardiovasc. Surg., vol. 49, January 1965.
- DEL PORTO F. et al. *Inflammation and immune response in acute aortic dissection.* Ann Med. (2010); 42: 622– 9.
- DEL PORTO F. et al. *The multitasking role of macrophages in Stanford A acute aortic dissection.* Cardiology (2014); 127: 123– 9.
- DIDANGELOS A. et al. *Extracellular matrix composition and remodelling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach.* Mol Cell Proteomics (2011); 10: M111.008128.
- ELHAGE R. et al. *Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice.* Cardiovasc. Res. (2003)59, 234–240.
- GHARAVI N.M. et al. *Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo.* J. Biol. Chem. (2007)282, 31460–31468.
- GHORESCHI K et al. *Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling.* Nature (2010) 467, 967–971.

- GIBSON CL. *Cerebral ischemic stroke: is gender important?* J Cereb Blood Flow Metab. (2013); 33(9):1355-1361.
- GREDMARK-RUSS S et al. *Active cytomegalovirus infection in aortic smooth muscle cells from patients with abdominal aortic aneurysm.* J Mol Med. (2009);87:347 – 56.
- GUARDAMAGNA O et al. *Endothelial activation, inflammation and premature atherosclerosis in children with familial dyslipidemia.* Atherosclerosis 207 (2009) 471-475.
- HAGAN PG, NIENABER CA, ISSELBACHER EM, BRUCKMAN D, KARAVITE DJ, RUSSMAN PL, EVANGELISTA A, FATTORI R, SUZUKI T, OH JK, MOORE AG, MALOUF JF, PAPE LA, GACA C, SECHTEM U, LENFERINK S, DEUTSCH HJ, DIEDRICHS H, MARCOS Y ROBLES J, LLOVET A, GILON D, DAS SK, ARMSTRONG WF, DEEB GM, EAGLE KA. *The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease.* JAMA. (2000); 283:897–903.
- HANSSON GK and HERMANSSON A. *The immune system in Atherosclerosis.* Nature Immunology (2011); 12(3): 204-212.
- HAUER A.D. et al. *Blockade of interleukin-12 function by protein vaccination attenuates atherosclerosis.* Circulation (2005)112, 1054–1062.
- HEISTAD DD, Armstrong ML. *Sick vessel syndrome. Can atherosclerotic arteries recover?* Circulation. (1994);89:2447–2450.
- HERMANSSON A et al. *Immunotherapy with tolerogenic apolipoprotein B-100-loaded dendritic cells attenuates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice.* Circulation (2011); 123(10):1083-91.
- HOEFER IE et al. *Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: specific role of*

monocytes, lymphocytes and granulocytes. Atherosclerosis (2005); 181(2):285-293.

- HORI S. et al. *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. *Science* (2003); 299:1057-1061.
- HUANG CT et al. *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity* (2004) 21:503–513.
- ISSELBACHER EM. *Thoracic and abdominal aortic aneurysms*. *Circulation* 2005; 111 : 816 - 28.
- IVANOV LI et al. *The orphan nuclear receptor rorgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. *Cell* (2006), 126, 1121–1133.
- KYAW T. et al. *Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis*. *J. Immunol.* (2010).185, 4410–4419.
- LIANG B. et al. *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. *J Immunol* (2008), 180:5916–5926.
- LIBBY P. *Inflammation in Atherosclerosis*. *Nature* (2002); 420 (6917):868-74.
- LIU F et al. *Sex differences in caspase activation after stroke*. *Stroke* (2009); 40(5):1842-1848.
- LIU ZHENDONG et al. *Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication*. *Atherosclerosis* (2012); 221:232-241.
- LUNDBERG A.M. & HANSSON G.K. *Innate immune signals in atherosclerosis*. *Clin. Immunol.* (2010) 134, 5–24.
- LUO F et al. *Inflammatory response is associated with aortic dissection*. *Ageing Res*

Rev. (2009); 8: 31– 5.

- MARIANN R. PIANO et al. *Impact of Smokeless Tobacco Products on Cardiovascular Disease: Implications for Policy, Prevention, and Treatment. A Policy Statement From the American Heart Association.* Circulation (2010); 122:1520-1544.
- MCGEACHY M.J et al. *The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo.* Nat. Immunol. (2009), 10, 314–324.
- MIYARA MAKOTO et al. *Functional delineation and differentiation dynamics of Human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor.* Immunity (2009); 30:899-911.
- NISHIKAWA T et al. *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.* Nature (2000); 404:787-790.
- OKAMURA T et al. *TGF- β 3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses.* Nat Commun. (2015) Feb 19;6:6329.
- SARAFF K et al. *Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2003);23:1621 – 6.
- SCHLITT A et al. *CD14 CD16 monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels.* Thromb Haemost. (2004);92:419–424.
- STARY HERBERT C et al. *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of Atherosclerosis.* Circulation (1995); 92(5):1355-1374.
- STARY HERBERT C et al. *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of Atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the*

Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation (1994); 89:2462-2478.

- TABAS I, WILLIAMS K.J. & BOREN J. *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. Circulation (2007) 116, 1832–1844.*
- TABAS I., Lichtman AH. *Monocyte-Macrophages and T cells in Atherosclerosis. Immunity. 2017 Oct 17;47(4):621-634.*
- TAN KC et al. *Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. Diabetes Care (2002); 25:1055-59.*
- TAURINO M. et al. *Metalloproteinase expression in carotid plaque and its correlation with plasma levels before and after carotid endarterectomy. Vascular and Endovascular Surgery (2008); 41(6):516-521.*
- TRIEBEL F et al. *LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. J Exp Med (1990), 171:1393–1405.*
- TSAI TT, NIENABER CH, EAGLE KA. *Acute aortic syndromes. Circulation. (2005); 112: 3802 - 13.*
- VAN EXEL E et al. *Inflammation and stroke: the Leiden 85-Plus Study. Stroke (2002) Apr; 33(4):1135-8.*
- VEILLARD N.R et al. *Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 2339–2344 (2004).*
- WATERHOUSE DF et al. *Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population. Vasc Health Risk Manag. (2008);*

4:177–187.

- WEBER C., FRAEMOHS L., DEJANA E. *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation*. Nature Review Immunology (2007) 7:467-477.
- WEBER C. and NOEL H. *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nature Medicine (2011); 17(11):1410-1422.
- YAMAMOTO H et al. *Impact of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes on coronary plaque vulnerability assessed by optical coherence tomography in coronary artery disease patients*. Atherosclerosis. (2018) Feb; 269:245-251.
- YOUNG BARBARA, HEATH JOHN W. *Wheater, istologia e anatomia microscopica*. Testo atlante. Terza edizione. Casa Editrice Ambrosiana 2001.
- YU SW et al. *Mediation of poly (adp-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor*. Science (2002); 297(5579):259-263.
- ZHEN-DONG LIU et al. *Increased Th17 cell frequency concomitant with decreased Foxp3⁺ Treg cell frequency in the peripheral circulation of patient with carotid artery plaques*. Inflammation Research (2012); 61:1155-1165.
- ZHOU LIANG et al. *TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function*. Nature (2008); 453:236-241.
- ZHOU X., NICOLETTI A., ELHAGE R., HANSSON GK. *Transfer of CD4(+) T cells aggravates Atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice*. Circulation (2000); 102(24):2919-2922.
- ZHU MENGYA et al. *Th17/Treg imbalance induced by increased incidence of Atherosclerosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)*. Clinical Rheumatology (2013); 32:1045-1052.

- (www.salute.gov).