

Alma Mater Studiorum Università di Bologna

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di Dottorato di Ricerca in

“Diagnostica Collaterale in Medicina Interna Veterinaria”

XX ciclo

Settore Scientifico Disciplinare: VET 08

Dipartimento Clinico Veterinario

Sezione di Medicina Interna

**IMPORTANZA PROGNOSTICA DELLE CITOCHINE E
LORO RUOLO NELL'IMMUNOMODULAZIONE:
RISULTATI DI STUDI SPERIMENTALI
*IN VIVO E IN VITRO.***

Dottorando: dott. Andrea Bonato

Coordinatore del Dottorato

Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Relatore:

Dott. Angelo Peli

Esame finale 2008

INDICE

INTRODUZIONE	2
PARTE GENERALE	3
1. RISPOSTA IMMUNITARIA ED INFIAMMAZIONE	4
1.1. RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA	6
1.1.1. Componenti dell'immunità innata	6
1.1.1.1. Barriere epiteliali	6
1.1.1.2. Granulociti neutrofili	6
1.1.1.3. Monociti/macrofagi (fagociti mononucleati)	7
1.1.1.4. Linfociti <i>Natural Killer</i> (NK)	8
1.1.1.5. Sistema del complemento	8
1.1.1.6. Citochine	9
1.1.1.7. Proteine di fase acuta	9
1.2. RISPOSTA IMMUNITARIA ACQUISITA	11
1.2.1. Componenti dell'immunità acquisita	11
1.2.1.1. Linfociti B	12
1.2.1.2. Linfociti T	12
1.2.2. Immunità cellulo-mediata	13
1.2.3. Immunità umorale	15
1.3. FASI DEL PROCESSO FLOGISTICO	16
1.3.1. Riconoscimento dei patogeni	16
1.3.1.1. Toll Like Receptor (TLR)	16
1.3.1.2. I superantigeni microbici	17
1.3.2. Reclutamento	19
1.3.3. Rimozione	20
1.3.4. Risoluzione	20
1.4. RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA	22
1.5. CLASSIFICAZIONE SIRS/SEPSIS	25
1.6. MARKER DI SIRS/SEPSIS	29
1.6.1. Marker plasmatici	29
1.6.1.1. Endotossine	29
1.6.1.2. Citochine	29
1.6.1.3. Procalcitonina	34
1.6.1.4. Proteina C reattiva	36
1.6.1.5. Neopterina	36
1.6.1.6. Marker endoteliali	36
1.6.1.7. Componente C3a del complemento	37
1.6.2. Cinetica dei marker plasmatici	37
1.6.3. Marker associati a cellule	38
1.6.3.1. MCH-II	38

1.6.3.2. CD14	38
2. LE CITOCHINE	39
2.1. Proprietà delle citochine	39
2.2. Le famiglie strutturali	42
2.3. Funzioni biologiche	43
2.4. Recettori citochinici	45
2.5. Segnali di attivazione recettoriale	47
2.6. Antagonisti delle citochine	49
2.7. Secrezione di citochine da parte di sottopopolazioni linfocitarie T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2)	50
2.8. Esempi di patologie coinvolgenti citochine	52
2.8.1. Lo shock settico di natura batterica	52
2.8.2. Shock tossico batterico causato da superantigeni	52
2.8.3. Neoplasie di natura linfoide e mieloide	53
2.8.4. Malattia di Chagas	54
2.9. Uso terapeutico delle citochine e dei loro recettori	54
2.10. Interleuchina 1 Beta (IL 1 β)	56
2.11. Interleuchina 2 (IL 2)	66
2.12. Interleuchina 4 (IL 4)	75
2.13. Interleuchina 6 (IL 6)	80
2.14. Interleuchina 8 (IL 8)	90
2.15. Interleuchina 10 (IL 10)	94
2.16. Tumor Necrosi Factor Alfa (TNF α)	104
2.17. Interferone gamma (IFN γ)	112
PARTE SPERIMENTALE	131
3. METODICHE	132
3.1. Estrazione dell'acido ribonucleico (RNA)	132
3.1.1. Estrazione dell'RNA mediante TRI REAGENT	132
3.1.2. Estrazione dell'RNA mediante QIAamp RNeasy Mini Kit (Qiagen)	132
3.2. Trattamento con DNAsi	133
3.3. Retrotrascrizione a cDNA (RT)	134
3.4. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	136
3.4.1. Specificità dell'amplificazione e selezione dei primers	137
3.4.2. Elettroforesi su gel di agarosio	144
3.5. Sequenziamento degli amplificati	144
3.6. Purificazione e clonazione di frammenti	145
3.7. Real Time PCR	147
3.7.1. Espressione dei risultati di Real Time PCR	150
3.8. Prelievo e maturazione di cellule derivanti da midollo osseo	152
3.9. Prelievo e preparazione degli splenociti	152
3.10. Proliferazione linfocitaria mediante timidina triziata 3(H)T	153
3.11. Quantificazione proteica con metodo <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	153
3.12. Quantificazione citochinica mediante Bioplex (Bio Rad)	155
3.13. Citometria a flusso	155
3.13.1. Basi tecniche di citometria a flusso	156

3.14. Analisi statistica	159
4. SPERIMENTAZIONI REALIZZATE	160
4.1. <i>Sperimentazione 1</i>	
Ruolo esercitato da recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi di tipo alfa (PPAR-α) nella regolazione dell'infiammazione acuta	160
4.1.1. Introduzione	160
4.1.2. Materiale e Metodi	162
4.1.3. Risultati	165
4.1.4. Discussione e Conclusioni	172
4.2. <i>Sperimentazione 2</i>	
Effetti del 17β-estradiolo nella trasduzione del segnale e nel danno secondario in lesione al midollo spinale sperimentalmente indotta	175
4.2.1. Introduzione	175
4.2.2. Materiale e Metodi	176
4.2.3. Risultati	179
4.2.4. Discussione e Conclusioni	182
4.3. <i>Sperimentazione 3</i>	
Valutazione dell'attività immunomodulatoria esercitata da componenti del colostro bovino mediante uso di modelli transgenici	185
4.3.1. Introduzione	185
4.3.2. Materiale e Metodi	185
4.3.3. Risultati	188
4.3.4. Discussione e Conclusioni	192
4.4. <i>Sperimentazione 4</i>	
Studio preliminare sulla risposta immunitaria innata indotta da <i>Staphylococcus aureus</i>	194
4.4.1. Introduzione	194
4.4.2. Materiale e Metodi	196
4.4.3. Risultati	201
4.4.4. Discussione e Conclusioni	207
4.5. <i>Sperimentazione 5</i>	
Valutazione della risposta immunitaria mediante quantificazione citochinica in soggetti persistentemente infetti da <i>Virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV)</i>	209
4.5.1. Introduzione	209
4.5.2. Materiale e Metodi	211
4.5.3. Risultati	214
4.5.4. Discussione e Conclusioni	216

4.6. Sperimentazione 6	
Variazioni della citomorfologia e dell'espressione genica di alcune citochine in corso di RAO sperimentalmente indotta in cavallo sportivo	218
4.6.1. Introduzione	218
4.6.2. Materiale e Metodi	219
4.6.3. Risultati	229
4.6.4. Discussione e Conclusioni	238
4.7. Sperimentazione 7	
Valutazione di marker in corso di setticemia dei puledri	240
4.7.1. Introduzione	240
4.7.2. Materiale e Metodi	240
4.7.3. Risultati	243
4.7.4. Discussione e Conclusioni	245
4.8. Sperimentazione 8	
La parvovirosi canina come modello di sepsi	247
4.8.1. Introduzione	247
4.8.2. Materiali e Metodi	249
4.8.3. Risultati	260
4.8.4. Discussione e Conclusioni	271
5. CONCLUSIONI FINALI	275
6. BIBLIOGRAFIA	276

INTRODUZIONE

Le citochine sono molecole proteiche prodotte da vari tipi di cellule e secrete in risposta ad uno stimolo. Esse sono in grado di modificare il comportamento di altre cellule inducendo attività quali crescita, differenziamento e apoptosi.

Negli ultimi anni anche in campo veterinario è stata rivolta particolare attenzione al ruolo che questi fattori rivestono; tali proteine sono in grado di agire come segnali di comunicazione intercellulare nell'immunità, nella riparazione cellulare e nell'ematopoiesi. Ad oggi sono state identificate numerose citochine e una loro maggior comprensione in ambito fisiologico, patologico e terapeutico rappresenta un argomento di ricerca interessante. In particolare il blocco della produzione di citochine, l'inibizione o la catalizzazione del legame al rispettivo recettore e l'inibizione del meccanismo di trasduzione del segnale potrebbero rappresentare innovative strategie terapeutiche.

La seguente tesi si pone quale obiettivo la comprensione del ruolo svolto da tali mediatori in corso di patologie naturali o sperimentalmente indotte. In particolare è stata valutata l'espressione genica e in alcuni casi proteica di un vasto *panel* di citochine in animali da sperimentazione, da affezione e da reddito indagando il loro coinvolgimento in corso di svariate situazioni fisiopatologiche e partendo da diverse matrici.

Considerando l'eterogeneità di materiali impiegati nelle diverse ricerche, si è avuto modo di mettere a punto molteplici metodiche e protocolli di estrazione di materiale genico e proteico. Differenti e numerose sono state pure le metodologie d'indagine applicate su tale materiale: Real Time PCR, citometria a flusso, metodiche ELISA, metodiche di sequenziamento e allineamento genomico e l'uso di colture di linfociti e di cellule derivanti da midollo osseo applicandole sia in virologia che in batteriologia.

L'applicazione di queste metodiche all'espressione citochinica potrà portare all'acquisizione di maggiori informazioni riguardo la risposta immunitaria attuata in diverse patologie animali, contribuendo a chiarirne i meccanismi patogenetici.

PARTE GENERALE

1. RISPOSTA IMMUNITARIA ED INFIAMMAZIONE

La risposta immunitaria rappresenta l'azione coordinata di numerose cellule, tessuti e loro prodotti solubili volta a riconoscere, attaccare e distruggere ciò che è "estraneo" all'organismo. Le strutture non *self* sono definite *antigeni* e comprendono agenti infettivi (batteri, virus, parassiti, miceti), materiali inerti ed elementi generati dall'ospite stesso quali le cellule neoplastiche. I vertebrati sono capaci di due tipi di risposta immunitaria: *innata* ed *acquisita*.

La risposta immunitaria innata (o naturale) rappresenta il primo argine di difesa contro diversi tipi di insulto ed è il sistema di difesa filogeneticamente più antico che si ritrova in tutti gli organismi pluricellulari, compresi le piante e gli insetti, mentre la risposta immunitaria acquisita (o specifica) compare per la prima volta nei vertebrati, e si rende complementare ai meccanismi dell'immunità innata al fine di potenziare la protezione dell'ospite nei confronti dei patogeni esterni (Abbas *et al.*, 2000).

Entrambe le risposte sono in grado di distinguere strutture *self* e *non self*, ma il grado di specificità e i meccanismi che sottostanno al riconoscimento dell'entità *non-self* sono diversi.

La risposta immunitaria **innata** si realizza rapidamente ogni volta che un agente esterno entra in contatto con l'organismo e il processo che viene messo in atto avviene in due fasi: una prima fase è caratterizzata dall'azione di elementi non specifici e non inducibili dell'ospite, quali barriere anatomiche e fisiologiche che operano in maniera passiva, ma costante, per impedire l'ingresso degli agenti estranei. La seconda fase è invece caratterizzata dall'azione di elementi effettori, dotati di recettori in grado di riconoscere un numero limitato di *pattern* molecolari comuni alla maggior parte dei patogeni, che danno il via a meccanismi di difesa che nel loro insieme vengono definiti con il termine di "infiammazione" (Mak *et* Saunders, 2006).

L'*infiammazione*, o flogosi, è la risposta dei tessuti vascolarizzati dell'organismo ad un insulto locale che comprende una serie di alterazioni nel letto vascolare, nel sangue e nel tessuto connettivo che sono preposte all'eliminazione dell'insulto e alla riparazione del tessuto danneggiato. L'infiammazione è un processo che coinvolge diversi tipi cellulari, fattori umorali e tissutali e prende avvio a seguito di un danno di cellule o tessuti conseguente ad infezioni (batteri, virus, parassiti, miceti), azione di sostanze chimiche, fattori fisici, alterazioni immunitarie e neoplasie. Nonostante sia stata ideata come meccanismo di difesa, il processo flogistico, se si realizza in maniera inappropriata, può condurre a profonde alterazioni sistemiche, determinando danni tissutali più gravi di quelli prodotti dall'insulto originario (Gruys *et al.*, 2005). In aggiunta, i prodotti derivanti dal danneggiamento tissutale, quali le cellule necrotiche, contribuiscono al perpetuarsi della risposta infiammatoria in maniera sproporzionata (Bochsler *et* Slauson, 2002).

La risposta immunitaria **acquisita** comprende meccanismi di riconoscimento ed effettori che sono altamente specifici per un preciso agente eziologico che ha dato il via alla risposta. Gli antigeni si legano in maniera specifica a recettori presenti sui linfociti T e B, i quali, assieme agli anticorpi da loro prodotti, riconoscono un numero potenzialmente illimitato di target, ma non agiscono in maniera immediata. I linfociti e i loro prodotti specifici persistono come "memoria immunitaria" e diventano rapidamente proteggenti in caso di riesposizione allo stesso agente.

Entrambe le risposte immunitarie, innata ed acquisita, devono funzionare correttamente affinché la difesa verso agenti esterni sia efficace. L'utilità della risposta innata non è limitata al "tamponamento" dell'insulto nell'attesa dello sviluppo e del potenziamento della risposta acquisita: in alcuni casi l'immunità innata riesce a controllare la *noxa* patogena ed è fondamentale per l'induzione della risposta acquisita, grazie alla produzione di diversi fattori,

quali molecole messaggere chiamate citochine. Dal canto suo la risposta immunitaria specifica può essere intesa come un'estensione più sofisticata della risposta innata, dato che il complesso del riconoscimento e le azioni delle cellule della memoria (così dette perché mantengono nel tempo la specificità per l'antigene) inducono molti degli effetti impiegati dalle cellule del sistema innato per la rimozione dei diversi tipi di insulto (Mak e Saunders, 2006).

1.1 LA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA

1.1.1 Componenti dell'immunità innata

Le componenti dell'immunità innata sono costituite dalle barriere epiteliali, nonché da cellule e molecole solubili che riconoscono i microrganismi patogeni o le sostanze da esse prodotte, avviando le risposte volte alla loro eliminazione. Le principali cellule effettrici dell'immunità innata sono i granulociti neutrofili, i fagociti mononucleati e i linfociti *natural killer* (NK), che attaccano i microrganismi penetrati nei tessuti o in circolo attraverso le barriere epiteliali. Nella risposta anti-microbica ciascuno di questi tipi cellulari svolge un proprio ruolo: alcune cellule, in particolare macrofagi e linfociti NK, secernono molecole, chiamate citochine, in grado di attivare i fagociti e la componente cellulare dell'immunità innata. Il processo flogistico consiste nel reclutamento e nell'attivazione di leucociti in sede di infezione, affinché possano eliminare l'agente patogeno. Se invece i microrganismi entrano nel torrente circolatorio, sono chiamate in causa numerose proteine plasmatiche di diversa natura: sistema del complemento, collectine, pentraxine e componenti dell'emostasi (Abbas *et al.*, 2000).

1.1.1.1 Barriere epiteliali

Le superfici epiteliali, se intatte, rappresentano una barriera fisica tra i microrganismi o altri tipi di insulto e i tessuti dell'ospite. Le principali superfici attraverso cui l'ospite si interfaccia con l'ambiente esterno sono la cute, le mucose dell'apparato gastro-intestinale e quelle dell'apparato respiratorio. Tutte e tre queste superfici sono protette da uno strato epiteliale continuo che previene l'ingresso degli agenti patogeni, e la perdita della sua integrità predispone solitamente all'insorgenza di infezioni. Gli epiteli producono peptidi dotati di attività antimicrobica naturale. Tra essi, i più studiati sono le *defensine* e le *criptocidine*. Le defensine sono presenti nella cute di molte specie animali e si ritrovano in gran quantità nei granuli dei neutrofili rappresentando circa il 5% delle proteine in essi contenute. Sono dotate di attività antibiotica ad ampio spettro, capace di uccidere un'ampia gamma di batteri e miceti; la loro sintesi viene stimolata da citochine pro-infiammatorie, quali interleuchina-1 (IL-1) e *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Le criptocidine sono invece presenti nell'epitelio del tratto gastro-enterico e sono peptidi dotati di potente attività antimicrobica, capaci di sterilizzare localmente il lume intestinale, ad esempio in corrispondenza delle cripte della parete. Il meccanismo d'azione di questi peptidi non è però completamente conosciuto. Le barriere epiteliali e le cavità sierose contengono, rispettivamente, linfociti T intra-epiteliali e linfociti B appartenenti alla sottopopolazione B1, i quali sono in grado di riconoscere i patogeni più comuni e montare una risposta nei loro confronti. In senso stretto apparterrebbero all'immunità acquisita, ma i recettori che presentano sono dotati di scarsa diversificazione e possono pertanto servire come meccanismo di difesa preconstituito verso i microrganismi che riescono a penetrare attraverso le barriere epiteliali (Abbas *et al.* 2000).

1.1.1.2 Granulociti neutrofili

I neutrofili costituiscono la popolazione numericamente più rappresentata tra i leucociti circolanti e mediano le fasi più precoci delle risposte infiammatorie. Il citoplasma contiene due tipi di granuli. La maggior parte di essi, denominati granuli *specifici*, contiene enzimi proteolitici, quali lisozima, collagenasi ed elastasi, mentre i restanti granuli, detti *azzurrofilo*, contengono essenzialmente il lisozima. I neutrofili originano dal midollo osseo, differenziandosi da uno stipite comune ai fagociti mononucleati; la loro generazione è favorita da una citochina chiamata *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) (Abbas *et al.*,

2000). Queste cellule vengono rilasciate in circolo grazie alla presenza di fattori chemiotattici, molecole derivate dal metabolismo batterico o delle cellule dell'ospite, in grado di richiamare i neutrofili nel tessuto che ha subito il danno dove, non appena giunti, prendono contatto, attraverso recettori di superficie, con il materiale estraneo che sequestrano in vescicole intracellulari dette *fagosomi*.

La distruzione del materiale fagocitato dai granulociti neutrofili si realizza attraverso processi ossigeno-indipendenti o ossigeno-dipendenti. I primi sono legati all'azione degli enzimi presenti nei granuli del citoplasma i quali attaccano i fagosomi conducendo all'idrolisi delle sostanze in essi contenute. I meccanismi ossigeno-dipendenti sono invece caratterizzati da una serie di reazioni biochimiche che generano grandi quantità di metaboliti reattivi dell'ossigeno, altamente tossici, che vengono rilasciati nel fagosoma. La generazione di queste specie chimiche è legata all'attivazione breve ed intensa del metabolismo respiratorio che viene indicata come "*respiratory burst*" (esplosione respiratoria) (Marshall, 2005). Gli enzimi rilasciati possono però causare danni ai tessuti dell'ospite stesso nel caso di una prolungata ed intensa risposta infiammatoria (Mak *et* Saunders, 2006). L'emivita di un neutrofilo è di circa 6 ore e se entro tale termine non viene reclutato in qualche focolaio flogistico, va incontro a morte programmata (apoptosi) e viene poi fagocitato dai macrofagi residenti nel fegato e nella milza.

1.1.1.3 Monociti/macrofagi (fagociti mononucleati)

I macrofagi ed i loro precursori circolanti, i monociti, svolgono un ruolo centrale sia nell'immunità innata che in quella specifica. Dal punto di vista filogenetico le cellule macrofagiche sono i mediatori più antichi dell'immunità innata. I monociti si generano dal midollo osseo dalla stessa linea mieloide che dà origine ai granulociti e possono rimanere in circolo per periodi prolungati (1-3 giorni); una volta penetrati nei tessuti si differenziano in macrofagi acquisendo una maggior attività fagocitaria che si accompagna ad un aumento dimensionale del citoplasma e numerico degli organuli (lisosomi, microtubuli, microfilamenti e membrane dell'apparato di Golgi), nonché esprimendo diversi *pattern* di molecole di superficie. I macrofagi risiedono nei tessuti connettivi, negli interstizi degli organi parenchimali, nel rivestimento dei sinusoidi vascolari splenici ed epatici e nei seni linfatici dei linfonodi: queste cellule sono quindi localizzate in maniera strategica a livello di tutti i siti attraverso cui le *noxae* flogogene possono penetrare nell'organismo. I macrofagi rispondono agli agenti patogeni con la stessa rapidità dei neutrofili, ma permangono molto più a lungo nei focolai flogistici. Presentano un'emivita maggiore rispetto ai neutrofili e diversamente da questi non sono cellule terminali, ma vanno incontro a proliferazione a livello di focolaio infiammatorio. Il ruolo che rivestono nell'immunità innata non è solo dato dalla funzione fagocitaria, ma anche dalla capacità di secernere diverse molecole coinvolte nel processo infiammatorio: citochine, necessarie a guidare i neutrofili e altre cellule immunitarie nel sito di flogosi, lisozima, componenti del complemento e mediatori lipidici quali leucotrieni e *Platelet Activating Factor* (PAF) (Mak e Saunders, 2006).

I macrofagi svolgono anche un'importante funzione come cellule accessorie dei linfociti dell'immunità acquisita: agiscono da cellule presentanti l'antigene, così dette perché catturano gli antigeni proteici extracellulari, li internalizzano e li processano, esponendo i peptidi da essi derivati in associazione a molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC). I linfociti T infatti riconoscono frammenti peptidici derivati dagli antigeni proteici e legati a molecole codificate dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità ed espresse sulla superficie cellulare. Le cellule che espongono peptidi associati a molecole MHC sono dette *Antigen Presenting Cells* (APC) e sono rappresentate, oltre che dai macrofagi, dalle cellule dendritiche e dai linfociti B.

Infine, nella fase di risoluzione dell'infiammazione, i macrofagi favoriscono il rimodellamento tissutale grazie alla secrezione di fattori angiogenetici (come il fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari, VEGF), fattori che stimolano la produzione di fibroblasti (come il fattore di crescita di derivazione piastrinica, PDGF) e fattori che regolano la sintesi di componenti del tessuto connettivo (quali il fattore di crescita trasformante, TGF- β) (Abbas *et al.*, 2000).

1.1.1.4 Linfociti *Natural Killer* (NK)

I linfociti NK sono una sottopopolazione di linfociti in grado di lisare cellule infettate da virus e di secernere citochine, in particolare interferone gamma (IFN- γ). I linfociti NK vengono attivati dal riconoscimento di tre tipi di strutture: cellule rivestite da anticorpi, cellule infettate da virus o da alcuni batteri intracellulari e cellule prive dell'espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (*Major Histocompatibility Complex*, MHC-I). Le funzioni effettrici dei linfociti NK sono la lisi di cellule infettate da virus e di cellule tumorali, nonché la secrezione di IFN- γ , che attiva la distruzione dei microrganismi fagocitati da parte dei macrofagi. Le cellule NK sono dotate di granuli che contengono una proteina, la *perforina*, capace di formare pori nelle cellule bersaglio, nonché alcuni enzimi, i *granzimi*, che penetrano nella cellula bersaglio attraverso i pori aperti dalle perforine, innescando il processo apoptotico (Abbas *et al.*, 2000).

1.1.1.5 Sistema del complemento

Il sistema del complemento è costituito da un complesso di più di 30 proteine plasmatiche e recettori di superficie cellulare prodotti in diversi distretti dell'organismo, ma soprattutto dai macrofagi, dagli epatociti e da cellule epiteliali dell'intestino e delle vie urinarie. Il complemento svolge un'ampia gamma di funzioni che vanno dalla lisi cellulare (batteri, eritrociti, cellule nucleate) al rinforzo delle risposte dei linfociti T e B (Carroll, 2004).

La cascata del complemento viene attivata in corso di infezioni e danno tissutale attraverso tre vie che condividono il passaggio comune di attivazione della componente C3 (**fig. 1.1**). La **via "classica"**, così definita perché scoperta per prima, si basa sull'interazione di IgM, IgG1 o IgG3, legate alla membrana dell'agente patogeno o ad altre strutture, con una proteina chiamata C1; la **via "alternativa"**, scoperta successivamente ma filogeneticamente più antica, viene attivata dall'interazione diretta con certe strutture di membrana dei microrganismi con C3. La **"via della lectina"** viene invece attivata da una proteina, la lectina legante il mannosio (*Mannose Binding Lectin*, MBL) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). La MBL interagisce con carboidrati provvisti di un residuo di mannosio o fucosio terminale, tipicamente presenti nelle glicoproteine e nei glicolipidi della parete batterica; esso è quindi capace di legarsi a proteine microbiche, ma non a proteine espresse dalle cellule dell'ospite. In circolo MBL si trova associata ad una proteasi serinica, che può attivare le componenti C2 e C4 che conducono poi all'attivazione di C3, bypassando così le prime tappe dell'attivazione del complemento per via classica ed alternativa. (Abbas *et al.*, 2000).

Ognuna di queste vie attiva il clivaggio della componente C3 in C3a e C3b. C3a è chemiotattica per i neutrofili, C3b si lega alla superficie degli agenti patogeni facilitando il riconoscimento di questi da parte dei fagociti e forma un complesso proteolitico con altre componenti del complemento per permettere il clivaggio di C5 nelle porzioni a e b. C5a richiama neutrofili ed altera la permeabilità vasale. C5b si lega alla membrana microbica e facilita la formazione del complesso composto da C6, C7, C8 e C9, che lisa la membrana cellulare dei batteri (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

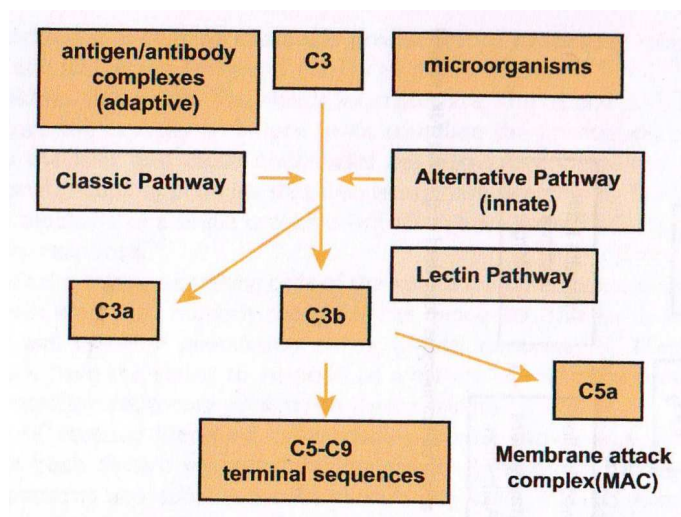


Fig. 1.1 Il sistema del complemento (Sherwood *et* Toliver-Kinsky, 2004).

1.1.1.6 Citochine

Le citochine sono proteine secrete da cellule coinvolte nella risposta di tipo innato ma anche acquisito. Sono prodotte in risposta a patogeni o altri antigeni e sono coinvolte in diverse risposte cellulari sia in ambito immunitario che infiammatorio.

Per un'ampia descrizione di tali componenti si rimanda ai capitoli successivi (**Capitolo 2**).

1.1.1.7 Proteine di fase acuta

Nelle prime fasi della risposta infiammatoria, citochine quali IL-1, IL-6 e TNF- α stimolano il fegato ed altri tessuti a produrre delle proteine note come “**proteine di fase acuta**” (*Acute Phase Proteins*, APPs) (Ceròn *et al.*, 2005).

Le APPs svolgono un ruolo importante nel ristabilire l'omeostasi mediando o inibendo i processi infiammatori, permettendo il trasporto di proteine e partecipando alla riparazione del tessuto. Tali proteine possono interagire con i monociti/macrofagi per favorire o sopprimere il rilascio di mediatori infiammatori, presentano attività emostatica, antitrombotica, antiproteolitica e microbica (Suffredini *et al.*, 1999; Moshage, 1997). La concentrazione plasmatica di alcune di queste proteine risulta diminuita in corso della risposta di fase acuta e per questo si parla di proteine di fase acuta **negative** (albumina e transferrina), mentre se la concentrazione risulta aumentata sono definite **positive** (Ceròn *et al.*, 2005).

APPs POSITIVE	APPs NEGATIVE
Proteina C reattiva	Albumina
Amiloide A sierica	Transferrina
Aptoglobina	
Fibrinogeno	
Ferritina	
Antitripsina α 1	
Glicoproteina acida α 1	
Ceruloplasmina	
Macroglobulina α 2	
Proteine del complemento	

L'aumento di concentrazione plasmatica varia dal 50% nel caso della ceruloplasmina fino a più di mille volte nel caso della proteina C reattiva e dell'amiloide A sierica. Condizioni che

determinano un notevole incremento delle concentrazioni delle APPs sono rappresentate ad esempio da infezioni, traumi, ustioni e cancro, mentre variazioni moderate si possono rilevare a seguito di forte esercizio, colpo da calore e al momento del parto (Gabay e Kushner, 1999).

Le principali proteine di fase acuta sono:

- **Proteina C reattiva** (*C-Reactive Protein*, CRP): è la prima proteina di fase acuta ad essere stata descritta e deriva il suo nome dalla sua capacità di legare il polisaccaride C di *Pneumococcus pneumoniae* (Ceròn *et al.*, 2005). La CRP è in grado di legarsi alla fosfocolina presente nei batteri e a costituenti fosfolipidici delle cellule tissutali danneggiate permettendo l'attivazione del complemento che favorisce la loro eliminazione. Inoltre, la CRP è in grado di indurre la sintesi di diverse citochine da parte dei monociti e di ridurre l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali nonché la produzione di radicali superossido dai neutrofili stessi (Gabay e Kushner, 1999).
- **Amiloide sierica A** (*Serum Amyloid A*, SAA): è un'apolipoproteina con funzioni chemiotattiche per il reclutamento di cellule nei siti di infiammazione e partecipa alla regolazione del processo infiammatorio attraverso l'inibizione del rilascio di mieloperossidasi e della proliferazione dei linfociti. La SAA è coinvolta nel metabolismo e nel trasporto di lipidi: si lega infatti alle HDL (*High Density Lipoproteins*) che vengono destinate ai macrofagi per il loro utilizzo come fonte energetica (Ceròn *et al.*, 2005).
- **Aptoglobina** (*Haptoglobin*, Hp): è una proteina capace di legare l'emoglobina libera che rappresenta un fattore tossico e proinfiammatorio derivato dal processo emolitico. Legando l'emoglobina libera, limita la disponibilità di ferro necessario alla crescita batterica. Hp inibisce la chemotassi e l'attività fagocitaria dei neutrofili ed agisce da antagonista per i recettori CD11 e CD18 della membrana dei leucociti (Ceròn *et al.*, 2005 e Gruys *et al.*, 2005).
- **Glicoproteina acida alpha-1** (*alpha-1-acid glycoprotein*, AGP): è un agente antinfiammatorio in grado di inibire l'attività di neutrofili e sistema del complemento. L'AGP induce la sintesi da parte dei macrofagi di un recettore che lega IL-1, IL-1 *receptor antagonist* (Ceròn *et al.*, 2005).
- **Ceruloplasmina** (*Ceruloplasmin*, Cp): è una glicoproteina plasmatica della frazione delle α_2 a cui è legata la maggior parte del rame circolante. Interviene nei processi di guarigione e cicatrizzazione e possiede un'azione protettiva le cellule dagli agenti ossidanti liberati dai fagociti (Ceròn *et al.*, 2005).

1.2 LA RISPOSTA IMMUNITARIA ACQUISITA

L'immunità di tipo acquisito si differenzia dall'immunità di tipo innato in quanto agisce in maniera specifica, ossia per ogni tipo di stimolo viene innescata una risposta che vale per quel preciso agente. Questa specificità assicura un alto grado di efficienza, in quanto evita le risposte non necessarie. Essa ha memoria immunologica e i tempi di risposta sono relativamente lunghi (da 96 h in poi).

1.2.1 Componenti dell'immunità acquisita

L'immunità specifica è costituita da linfociti T, linfociti B e cellule accessorie.

I linfociti T si suddividono in linfociti T helper $CD4^+$ e linfociti T citotossici (CTL) $CD8^+$.

La funzione effettrice dei primi è quella di attivare i macrofagi, i linfociti B e di mediare il processo infiammatorio mediante il reclutamento di varie cellule con produzione di citochine. La funzione effettrice dei secondi invece è quella di lisare le cellule infette.

Nel differenziamento linfocitario si possono individuare principalmente due fasi: una fase antigene dipendente e una antigene indipendente.

Nella fase antigene indipendente, che avviene negli organi linfoidi primari (midollo osseo e timo), vengono inizialmente prodotti linfociti provvisti di tutti i recettori per ogni tipo di antigene; successivamente alla fine di questo processo sono isolabili linfociti maturi che sono considerabili come "vergini" in quanto saprebbero riconoscere l'antigene ma non lo hanno mai incontrato direttamente. La fase antigene dipendente che si svolge negli organi linfoidi secondari determina l'incontro tra l'antigene e il linfocita che possiede il recettore adatto.

A questo punto si formano due categorie di cellule:

1. **cellule della memoria:** un pool di cellule capaci, in casi di rimanifestarsi dell'attacco patogeno, di velocizzare moltissimo la risposta adattativa da affiancare alla risposta innata;
2. **cellule effettrici,** in grado esse stesse di combattere e distruggere il patogeno (esempio per i linfociti B le plasmacellule)

Tutte le cellule della linea leucocitaria derivano da un unico progenitore staminale multipotente riconoscibile dalla molecola CD34 ($CD34^+$). Successivamente viene creata una cellula staminale linfoide (**Fig 1.2**).

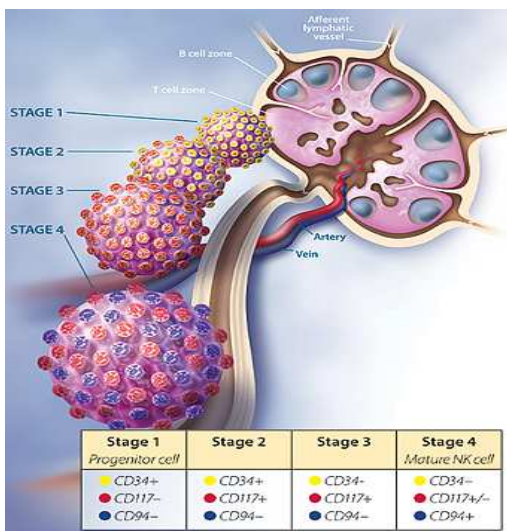


Fig 1.2

Espressione dei cluster di differenziazione su cellule della linea leucocitaria.

I linfociti maturi sono riconoscibili in quanto esprimono 5 famiglie di recettori: i recettori per l'antigene (TCR), i recettori MHC (sistema maggiore di istocompatibilità), recettori per fattori di crescita, recettori homing (consente al linfocita di essere indirizzato verso un organo linfoide secondario oppure verso un organo specifico in cui vi è proliferazione di patogeni) e recettori di interazione cellula-cellula (Abbas, 2000)..

1.2.1.1 Linfociti B

I linfociti B sono cellule che, in seguito a stimolazione antigenica, sono capaci di proliferare e trasformarsi in cellule effettrici, le plasmacellule, queste ultime capaci di liberare anticorpi. Gli anticorpi o immunoglobuline sono proteine specifiche che riescono ad identificare in maniera precise e pressoché univoca specifici antigeni. Sono note 5 classi di Ig (dette M, A, G, D ed E). I linfociti "vergini" sono evidenziabili appunto grazie alla molecola IGM+. Una volta che il patogeno viene circondato da anticorpi sensibili a magari più antigeni del patogeno stesso, viene attivato il sistema del complemento che provvede alla lisi del patogeno e richiama i macrofagi che fagocitano il patogeno. Il linfocita B può anche usare un sistema di opsonizzazione limitandosi a rendere il patogeno riconoscibile al macrofago oppure in caso di presenza di tossine può provvedere a neutralizzarle affinché sempre il macrofago possa distruggerle (Abbas, 2000).

1.2.1.2 Linfociti T

I linfociti T riescono a riconoscere un antigene "presentato" sulla superficie di una cellula complessato con le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), e non quindi nella sua forma solubile.

I linfociti T possiedono un sistema di recettori, TCR/CD3, tramite i quali riescono a riconoscere il peptide antigenico, presente in un complesso con le proteine dell'MHC. I peptidi espressi sulla cellula assieme alle proteine dell'MHC non derivano solo da antigeni, ma anche dal metabolismo cellulare, dopo digestione nel proteosoma, e possono essere quindi anche "molecole self", vale a dire proprie dell'organismo stesso e non provenienti da organismi estranei. Nel caso in cui una cellula sia infettata da virus, il virus stesso ineluttabilmente induce la cellula a produrre delle proteine che servono alla proliferazione virale e alcune di queste proteine virali vengono lise dai proteosomi e presentate sulla cellula infetta provocando il marcamento per un linfocita di tipo T della cellula infettata. I linfociti T non hanno però solo una funzione effettrice capace di eliminare cellule tumorali, infette e organismi patogeni, ma hanno anche una funzione regolatoria tramite la produzione di linfocine, molecole che sono alla base di fenomeni di cooperazione cellulare nella risposta immunitaria. Le cellule a funzione effettrice possiedono la molecola di riconoscimento CD8 (sono dette CD8+) e sono i linfociti T citotossici (CTL); le cellule con funzione regolatrice sono marcate dalla CD4 (dette CD4+) e sono i linfociti T helper (Th) (Farrar *et al.*, 2002).

I linfociti T hanno una metodologia di differenziamento particolare che avviene nel timo. Nella zona capsulare di questo possiamo trovare i timociti, linfociti non ancora maturi, che esprimono sulla loro superficie la molecola CD7 e non quella caratterizzante la loro specie linfoide, la CD3. Un secondo stadio avviene nella zona corticale in cui i timociti sono immersi in maglie epiteliali che producono fattori di crescita aiutandone così la maturazione. Successivamente vi è un riarrangiamento del TCR/CD3 che è molto simile a quello delle immunoglobuline in questo stadio il linfocita esprime sia CD4 (tipica del T helper) sia CD8 (tipica del linfocita effetttore).

In seguito a processazione dell'antigene da parte delle *Antigen Presenting Cell* (APC) si ha l'esposizione di questo sui complessi maggiori di istocompatibilità (MHC). Il riconoscimento di questo complesso da parte dei recettori dei linfociti T (TCR) innesca una risposta che può essere di tipo anticorpale o cellulo mediata. Da ricordare che le cellule CD8⁺ riconoscono i MHC di I tipo mentre i CD4⁺ quelle di tipo II.

L'immunità acquisita può essere pertanto distinta in 2 sottotipi :

- cellulo-mediata, legata alla presenza di linfociti T. Tale immunità può essere trasferita in individui mediante linfociti T prelevati da un individuo immunizzato
- umorale, mediata da anticorpi, in cui le cellule coinvolte sono i linfociti B. Tale immunità può essere trasferita in soggetti non immunizzati mediante plasma o siero

1.2.2 Immunità cellulo-mediata

L'immunità di tipo cellulo mediato è coinvolta nella difesa contro i microrganismi intracellulari ed è espletata dai linfociti T. Vi sono 2 principali forme di immunità cellulo mediata.

La prima, che prende ad esempio le reazioni di ipersensibilità di tipo ritardato (DHT), vede i linfociti Th1 CD4⁺ e linfociti CD8⁺ coinvolti nel riconoscere antigeni di microrganismi ingeriti dai fagociti, attivando il fagocita ad eliminarli. Nella seconda tipologia di risposta cellulo mediata si assiste all'azione di linfociti CD8⁺ citotossici capaci di uccidere tutte le cellule nucleate contenenti antigeni estranei (antigeni tumorali o microbici) all'interno del citosol (Seder *et Ahmed*, 2003).

Le reazioni immuni di tipo cellulo mediato possono essere suddivise in numerosi passaggi: il riconoscimento da parte di linfociti T naive di antigeni associati a cellule in organi linfoidei periferici; l'espansione clonale di linfociti T e la loro differenziazione verso cellule effettrici; la migrazione di tali cellule effettrici verso il sito di infezione; l'eliminazione del microrganismo o dell'antigene.

I linfociti CD4⁺ si possono differenziare verso il fenotipo Th1, cellule effettrici che secernono interferone gamma (IFN γ) favorendo un'immunità fagocita mediata (Boehm *et al.*, 1997), o verso il fenotipo Th2 capaci di secernere interleuchina 4 e 5 (IL4 e IL 5), che favoriscono le reazioni immunitarie modulate da eosinofili e mastociti e la produzione di immunoglobuline E (IgE).

La differenziazione verso una sottopopolazione Th1 piuttosto che Th2 è controllata dalla produzione di citochine prodotte dalle Antigen Presenting Cells (APCs) o dagli stessi linfociti T.

I linfociti CD8⁺ si differenziano nei linfociti citotossici, acquisendo la capacità di uccidere cellule target sotto l'influenza di moleole costimolatorie e mediante l'aiuto di linfociti CD4⁺.

La migrazione dei linfociti T verso i siti di infezione dalla liberazione di chemochine quali ad esempio l'interleuchina 8, che permettono il legame fra cellule endoteliali attivate e molecole di adesione presenti sui linfociti stessi (Choi *et al.*, 2004).

L'attivazione dei macrofagi mediata dalla popolazione linfocitaria Th1 prevede la presenza di IFN γ e dell'interazione CD40L-CD40 (Grewal *et Flavell*, 1998). Tale azione permette l'uccisione dei microrganismi fagocitati, stimola l'infiammazione e ripara il tessuto danneggiato. Se l'infezione non viene completamente risolta, i macrofagi si possono rilevare dannosi determinando a loro volta danno tissutale e fibrosi.

I linfociti citotossici CD8+ uccidono le cellule esprimenti peptidi derivanti da antigeni citosolici (ad esempio di natura virale) presentati in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I).

L'eliminazione di tali cellule è attuata principalmente mediante liberazione per esocitosi di granuli contenenti granzimi e perforina. La perforina permette l'ingresso di granzimi nel citoplasma delle cellule bersaglio, iniziando così i processi di apoptosi (**Fig.1.3**) Questi ultimi sono ulteriormente innescati dall'espressione del recettore FasL che va a legarsi ai recettori Fas presenti sulla membrana delle cellule bersaglio, stimolando ulteriormente l'apoptosi 8 (Raja *et al.*, 2003).

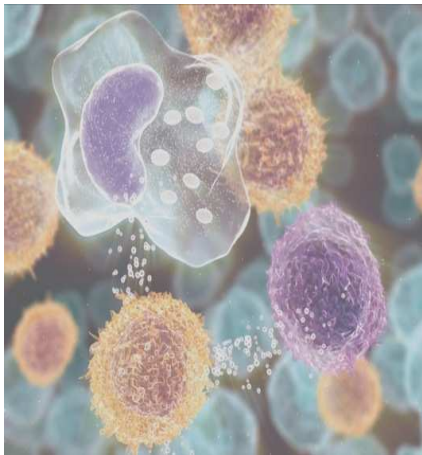


Fig 1.3 Liberazione di granuli contenenti perforina e granzimi

1.2.3 Immunità umorale

L'immunità di tipo umorale invece coinvolge gli anticorpi e tale componente del sistema immunitario acquisito è responsabile della difesa contro organismi extracellulari e tossine microbiche. Tali anticorpi possono essere prodotti da cellule a lunga vita secernenti anticorpi generate da una prima esposizione all'antigene microbico o da una riattivazione di cellule B della memoria (Abbas *et al.*, 2000).

Il processo di difesa umorale inizia quando un linfocita rileva un agente esterno grazie al suo recettore specifico, ossia che rileva uno ed un solo corpo esterno, (ci sono vari gruppi di linfociti B che hanno diversi recettori) e inizia la produzione di cellule clone che in parte saranno destinate alla memoria immunologica e in parte andranno a formare le plasmacellule. Queste poi produrranno gli anticorpi che si legheranno al corpo esterno bloccando i suoi siti attivi facilitando la fagocitosi da parte dei macrofagi.

Le funzioni effettrici degli anticorpi includono la neutralizzazione dell'antigene, la fagocitosi di particelle opsonizzate dipendente dal recettore per la frazione costante (Fc) e l'attivazione del sistema del complemento (Barrington *et al.*, 2001).

Gli anticorpi liberati sono in grado di bloccare o neutralizzare l'infettività del patogeno legandosi sulla sua superficie impedendo così stericamente il legame con altri recettori posti sulle cellule. Allo stesso modo bloccano l'azione esercitata dalle tossine prevenendo il legame con le cellule dell'ospite. Le particelle opsonizzate, cioè ricoperte di anticorpi, sono fagocitate grazie al legame che si viene ad instaurare fra frazione costante degli anticorpi (Fc) e recettori per tale ligando poste sulla membrana del fagocita (Abbas *et al.*, 2000).

Vi sono molti tipi di recettori per Fc differenziati in base ai differenti anticorpi IgG, IgA ed IgE. Il legame fra antigene complessato alle Ig e recettore per Fc posto sui fagociti stimola ulteriormente l'attività microbicida di tale componente cellulare (Radaev *et al.*, 2002).

Sono indispensabili entrambe le immunità specifiche perché, mentre l'immunità umorale costituisce un meccanismo di difesa nei confronti di microbi extracellulari e delle loro tossine, dal momento che gli anticorpi possono legarsi a tali agenti ed eliminarli, l'immunità cellulo-mediata è indispensabile per la difesa contro microrganismi intracellulari, come virus e batteri, che proliferano all'interno delle cellule dell'ospite e quindi risultano essere inaccessibili agli anticorpi, ma accessibili ai linfociti T specifici che determinano la loro morte.

1.3 FASI DEL PROCESSO FLOGISTICO

Una delle possibili classificazioni del processo flogistico è basata sulla sua suddivisione in quattro stadi, le quattro “R”, ognuno dei quali è coordinato da mediatori umorali e cellulari e coinvolge diversi tipi di cellule nell’avvio, progressione e termine della risposta. I quattro stadi sono: riconoscimento, reclutamento, rimozione e risoluzione (**fig. 1.4**).

1.3.1 RICONOSCIMENTO DEI PATOGENI

L’invasione dell’organismo da parte di microrganismi e il danno tissutale risultante vengono rilevati da recettori delle cosiddette “cellule sentinella”: macrofagi, cellule dendritiche e mastociti. I microrganismi non solo si moltiplicano rapidamente, ma riescono anche a mutare e modificare le loro strutture molecolari in maniera molto più rapida della capacità di risposta dell’organismo. I recettori delle cellule sentinella non sono quindi programmati per il riconoscimento di tutte le possibili molecole microbiche, ma riconoscono molecole altamente conservate o presenti nella gran parte dei microrganismi. I più importanti tra questi recettori cellulari sono i *Toll-Like Receptors* (TLRs) (Tizard, 2004).

1.3.1.1 Toll-Like Receptors (TLRs)

I TLRs rappresentano una famiglia di proteine recettoriali di superficie presenti in numerose cellule e aventi la funzione nei mammiferi di riconoscere componenti molecolari conservate dei microrganismi che sono state definite *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Il nome deriva dall’omologia con un recettore denominato *Toll* presente nella *Drosophila*. Si conoscono 11 diversi TLRs nei mammiferi, 10 dei quali sono funzionanti nell’uomo (**tab 1.1**).

La componente extracellulare del TLR consiste di sequenze ricche in leucina, mentre la componente intracellulare presenta domini altamente conservati omologhi al recettore citoplasmatico dell’IL-1 e per questo detti TLR/IL-1R (TIR).

Questi domini interagiscono con diverse proteine citoplasmatiche (MyD88, TIRAP/MAL, TRAM e TRIF) che danno avvio ad una cascata di segnali molecolari che inducono la traslocazione del *Nuclear Factor-kB* (NF-kB) nel nucleo, fattore che permette la trascrizione di geni codificanti per diversi mediatori flogistici.

La scoperta che un limitato numero di recettori dà avvio ad un’ampia gamma di risposte infiammatorie, ha sollevato l’ipotesi che ci siano ligandi endogeni in grado di iniziare un’inflammatione “sterile”, in assenza di microrganismi, e tra questi ligandi vi sono molecole derivate dal danno tissutale (Warren, 2005).

	<i>Ligandi microbici</i>	<i>Ligandi endogeni</i>
TLR1	Lipopeptidi triacile batteri*	cellule necrotiche?
TLR2	peptidoglicano, ac.lipoteicoico, lipoproteine batteriche, porine, zimosano, proteine envelope virale.	cellule necrotiche
TLR3	ds RNA virus	
TLR4	LPS, ac.lipoteicoico, proteina F virus, pneumolisina, glicoinositolfosfolipidi protozoi	HSP60, HSP70, ac.ialuronico, proteina surfactante polmonare, fibronectin, fibrinogeno A
TLR5	flagellina batteri Gram –	
TLR6	Lipopeptidi diacile batteri*	cellule necrotiche?
TLR7	ssRNA virus	
TLR8		
TLR9	CpG DNA (batteri, protozoi, virus), emozoina protozoi	complessi cromatina-IgG
TLR10	?	
TLR 11	Molecola profilin-like protozoi, componente batteri uropatogeni*	

Tab. 1.1 Classificazione dei *Toll-Like Receptors (TLRs)* e relativi ligandi microbici ed endogeni (Murphy *et al.* 2004; Uematsu *et Akira*, 2006*).

In corso di endotossiemia, la presenza in circolo del lipopolisaccaride (LPS) della parete dei batteri Gram-negativi, risulta un potente induttore dell'immunità innata. Il lipide A, una componente del LPS, si lega ad una proteina plasmatica di fase acuta, *LPS-Binding Protein (LBP)* che ha il compito di trasferire LPS al recettore di membrana dei macrofagi, presente anche in forma solubile, CD14. Quest'ultimo, poiché manca di un dominio transmembrana, si lega poi al complesso formato da TLR4 ed una proteina di membrana, MD2, del macrofago permettendo il reclutamento delle proteine citoplasmatiche che vanno ad attivare il NF- κ B, che a sua volta regola la trascrizione di geni che codificano per molecole pro-infiammatorie quali le citochine (Uematsu *et Akira*, 2006).

I principali mediatori coinvolti nell'avvio della cascata infiammatoria sono le citochine, i costituenti della cascata dell'acido arachidonico (trombossani, leucotrieni, prostaglandine), il fattore di attivazione piastrinico (*Platelet activating factor, PAF*) e i radicali liberi (ossido nitrico e radicali ossigeno).

Tra le citochine, *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)* e interleuchina 1 (IL-1) sono le prime ad essere secrete, appaiono in circolo entro un'ora dall'insulto ed hanno effetti simili svolgendo la loro azione sui macrofagi, sui monociti, sulle cellule endoteliali e sui neutrofili con effetti locali e sistemici. Altre due importanti citochine coinvolte nei primi stadi dell'infiammazione sono l'interleuchina 6 (IL-6) e l'interleuchina 8 (IL-8). La prima è responsabile della produzione delle proteine di fase acuta, mentre IL-8 è una chemochina responsabile del reclutamento dei neutrofili (Nystrom, 1998).

1.3.1.2 I superantigeni microbici

I superantigeni microbici sono una famiglia di proteine con caratteristiche particolari, che hanno la capacità di scatenare una eccessiva ed aberrante attivazione delle cellule T: si tratta di prodotti microbici che interferiscono con l'immunità dell'organismo ospite, riuscendo a *by-passare* i meccanismi convenzionali di processazione dell'antigene.

Il legame dei superantigeni al recettore dei linfociti T (TCR) e sulla superficie esterna dell'MHC induce l'attivazione, la differenziazione e la proliferazione di queste cellule, con conseguente rilascio di citochine infiammatorie (Torres *et al.*, 2001). Questa attivazione, a differenza di quella indotta da un qualunque altro antigene, è aspecifica, cioè viene indotta indipendentemente dall'epitopo antigenico che i linfociti sono in grado di riconoscere. I superantigeni infatti si legano alla regione variabile V della catena β ($V\beta$) del TCR, che, insieme alle regioni variabili $D\beta$, $J\beta$, $V\alpha$, $J\alpha$ concorre alla formazione della regione ipervariabile, cioè del sito di legame altamente specifico per l'antigene che caratterizza in maniera unica un certo clone linfocitario. La regione $V\beta$, presa singolarmente, è però condivisa da più cloni di linfociti; inoltre i superantigeni possono legare più di una famiglia di regioni $V\beta$, quindi sono in grado di stimolare tutti i linfociti T portatori di quelle regioni. Il numero di linfociti T attivati dipenderà da quante regioni $V\beta$ possono essere riconosciute dal superantigene, e da quanto numerosi sono i linfociti T portatori di quelle regioni. Poiché il numero delle differenti regioni $V\beta$ delle cellule T è limitato più o meno a 50, e poiché la maggior parte dei superantigeni può legarne più di uno, fino al 25% delle cellule T dell'individuo possono essere attivate in questo modo (McCormick *et al.*, 2001).

I superantigeni inoltre hanno evoluto diversi meccanismi per legarsi alle molecole MHC di classe II^a (Jardetzky *et al.*, 1994): il legame avviene in un sito distinto da quello specifico per l'antigene, quindi non ha luogo la processazione; questa interazione induce l'APCs ad esprimere il segnale costimolatorio richiesto per l'attivazione del linfociti T che porta alla formazione di un ponte tra TCR e MHC II, con la conseguente proliferazione di tutti i linfociti T riconosciuti da quel superantigene. Il rilascio più o meno intenso di citochine infiammatorie, inizialmente il TNF α , seguito dall'interleuchina 6, l'interferone (IFN γ) e l'IL-2, sono responsabili della reazione patologica.

Successivamente avviene il reclutamento di ulteriori linfociti T e B dal luogo dell'infezione, e la co-attivazione delle cellule che presentano l'antigene, che rispondono con il rilascio di mediatori pro-infiammatori come IL1 e TNF α (Arad *et al.*, 2000).

Il rilascio eccessivo non coordinato delle citochine infiammatorie, e in particolare di TNF α , si pensa essere responsabile dei sintomi clinici della sindrome da shock tossico (Miethke *et al.*, 1992).

Nelle enterotossine di *S.aureus* l'interazione col TCR avviene a livello della cavità che si trova sulla sommità della proteina stessa, mentre l'interazione con l'MHC II avviene in quattro regioni principali (per SEB) prevalentemente localizzate nel dominio B in prossimità del loop (Dinger *et al.*, 2000).

Per via del meccanismo d'azione di queste tossine, la risposta dei diversi soggetti ad un determinato superantigene sarà strettamente individuale e modulata dal polimorfismo allelico dei loci codificanti per l'MHC II e per il TCR. I soggetti che esprimono un'alta frequenza di linfociti T dotati di TCR con regioni $V\beta$ riconosciute dal superantigene, saranno più predisposti a manifestare una risposta imponente, rispetto ad individui in cui questi linfociti sono poco rappresentati. Lo stesso vale per le diverse molecole MHC II, le quali possono avere differenti affinità di legame con il superantigene (Kotb, 1995).

In generale dunque gli effetti negativi sull'ospite sono imputabili a:

- iperproduzione di citochine infiammatorie;
- citotossicità cellulare mediata da superantigeni rivolta verso le cellule che hanno presentato il superantigene; la loro eliminazione riduce il numero di APCs che potrebbero presentare antigeni microbici, e ciò ritarda la risposta immunitaria contro i patogeni;

- incapacità di rispondere ai patogeni conseguentemente all'intensa stimolazione da parte dei linfociti T;
- apoptosi di linfociti T già attivati dai patogeni.

Tutto questo concorre a rendere le difese immunitarie dell'ospite meno efficaci.

I superantigeni più comuni sono le enterotossine stafilococciche e le esotossine pirogene streptococciche, che innescano le rispettive sindromi di shock tossico, stafilococciche e streptococciche. *S. aureus* e *Str. pyogenes* producono insieme 19 differenti superantigeni. La gamma di microrganismi conosciuti per la capacità di produrre i superantigeni si è espansa, includendo batteri Gram negativi, Micoplasmi e i virus (Marrack *et* Kappler, 1990).

Gli effetti dei superantigeni sull'organismo possono essere acuti (tossinfezioni alimentari, sindrome da shock tossico) o a lungo termine, includendo tra questi malattie autoimmuni (es. sclerosi multipla) e sindromi da immunodeficienza (es. HIV).

Le tossinfezioni alimentari sono le manifestazioni acute più comuni causate dalle enterotossine dello *S.aureus*. Questo effetto può essere indipendente dalla stimolazione delle cellule T, poiché l'enterotossina SEB è in grado di legarsi a molecole MHC II presenti sulla superficie di cellule non linfoidi, nel caso specifico dei mastociti, i quali vengono indotti a rilasciare LTB4 e PGE2, responsabili dell'emesi.

In Medicina Veterinaria il ruolo dei superantigeni non è stato ancora approfondito, ma la comprensione delle loro funzioni biologiche e del loro meccanismo d'azione può essere d'aiuto nel comprendere come molecole tipo le enterotossine di *S.aureus* possano quantomeno favorire ed influenzare alcuni stati patologici.

1.3.2 RECLUTAMENTO

La migrazione dei leucociti nei focolai d'infezione è guidata dalle citochine e mediata dall'interazione tra recettori di localizzazione espressi dai leucociti e i relativi ligandi presenti sulle cellule endoteliali. Le citochine più importanti in questo processo, prodotte in risposta all'infezione dai macrofagi, dalle cellule endoteliali e da altri tipi cellulari, sono TNF ed alcune chemochine. Il TNF induce nelle cellule endoteliali l'espressione sequenziale di alcune molecole che mediano l'adesione preferenziale di tipi diversi di leucociti. Nel giro di 1-2 ore dall'esposizione al TNF, le cellule endoteliali esprimono E-selectina, che determina un debole legame all'endotelio di neutrofili ed altri leucociti, i quali, per azione della pressione sanguigna, cominciano a "rotolare" lentamente lungo la parete vasale. A distanza di 6-12 ore, si ha l'espressione sull'endotelio di *Vascular Cell Adhesion Molecole* (VCAM-1) e *Intercellular Adhesion Molecole* (ICAM-1), che si legano alle integrine presenti su neutrofili e monociti consentendo una solida adesione di questi ultimi, seguita dalla loro migrazione nei tessuti attraverso le giunzioni inter-endoteliali. Anche le chemochine sono coinvolte nel reclutamento dei leucociti nel focolaio di infezione: esse favoriscono il loro legame all'endotelio e ne stimolano la migrazione nei tessuti. Le chemochine agiscono sui leucociti debolmente adesi alla parete vasale tramite il legame ai glicosaminoglicani espressi sulla membrana delle cellule endoteliali: l'affinità delle integrine per i loro ligandi aumenta, con conseguente stabilizzazione dell'adesione dei leucociti all'endotelio e transmigrazione attraverso la parete del vaso. Dopo che i leucociti hanno fatto il loro ingresso nei tessuti, le chemochine ne stimolano direttamente la migrazione, o chemiotassi, lungo un gradiente di concentrazione crescente (Abbas *et al.*, 2000). L'attivazione delle cellule del sistema immunitario e dell'endotelio si evidenzia clinicamente con i classici segni dell'infiammazione: *calor, rubor, tumor, dolor e functio laesa*. Le cellule

infiammatorie, però, se attivate in maniera eccessiva o inappropriata, possono condurre ad uno stato incontrollato di infiammazione sistemica caratterizzato da riduzione della capacità cellulare di utilizzo dell'ossigeno, deplezione di ATP, danno e morte cellulare (Bellingan, 1999).

1.3.3 RIMOZIONE

Nella fase di rimozione il processo infiammatorio si avvale di citochine capaci di attivare e di indurre la differenziazione di cellule che provvedono alla rimozione di un antigene o di un agente infettivo. Si tratta di citochine che promuovono attività nei neutrofili, macrofagi e linfociti, come IFN- γ , IL-2 e IL-6 (Marcato, 2000). La principale funzione effettrice dei neutrofili e dei macrofagi è la lisi dei microrganismi fagocitati mediante fusione dei fagosomi con i lisosomi e la produzione di molecole ad attività microbica quali lisozima, elastasi, sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) e radicali ossigeno. Il tessuto danneggiato viene anch'esso rimosso per evitare la continua stimolazione del sistema immunitario. Le sostanze chimiche, quali ossido nitrico, radicali ossigeno, lisozima ed elastasi, non discriminano fra microrganismi e strutture *self* e quindi l'eccessiva produzione e rilascio di questi prodotti nello spazio extracellulare può condurre al danneggiamento dei tessuti dell'ospite e all'amplificazione del processo infiammatorio (Abbas *et al.*, 2000).

1.3.4 RISOLUZIONE

Con il progredire del processo flogistico, le cellule coinvolte, in particolare i macrofagi, cambiano le loro proprietà allo scopo di promuovere la risoluzione del processo flogistico. Iniziano gradualmente a produrre un inibitore della serina proteasi, *Serine Leukocyte Protease inhibitor-1* (SLP-1). Questa molecola inibisce il rilascio di elastasi e sostanze ossidanti prodotte dai neutrofili stimolati dal TNF. SLP1 protegge dalla degradazione il *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β), citochina inibente la proliferazione di linfociti e l'attivazione dei macrofagi. I neutrofili iniziano a secernere recettori solubili per TNF e IL-1 (*soluble TNF*, IL-1 *receptors* e IL-1 *receptor antagonist*) che vanno a legare e neutralizzare. TNF- α induce i macrofagi a produrre IL-12 che a sua volta porta alla produzione di IFN- γ da parte dei linfociti. IFN- γ , nelle prime fasi dell'infiammazione, agisce da attivatore dei macrofagi, mentre negli ultimi stadi ha un ruolo soppressore. Le sostanze ossidanti prodotte da neutrofili e macrofagi distruggono i fattori chemiotattici, mentre citochine anti-infiammatorie come TGF- β , IL-4 e IL-10 inibiscono il rilascio di TNF- α (Abbas *et al.*, 2000).

La risoluzione del processo flogistico richiede una rapida eliminazione delle cellule infiammatorie, in particolare neutrofili e monociti, una volta che queste hanno svolto la loro funzione, in modo che non provochino esse stesse un danno ai tessuti dell'ospite. La via principale per tale eliminazione è l'apoptosi o morte cellulare programmata che prevede una serie di alterazioni morfologiche che avvengono mantenendo la membrana cellulare intatta fino al momento in cui le cellule verranno fagocitate dai macrofagi. In questo modo viene impedita la liberazione del contenuto cellulare potenzialmente tossico, come si verifica in corso di necrosi. I macrofagi e i linfociti generalmente non vanno incontro ad apoptosi, se non a seguito di uno stimolo intenso, ma migrano verso il linfonodo drenante dove agiscono da cellule presentanti l'antigene e dove avviene l'espansione clonale. Le cellule parenchimali, infine, vanno incontro ad una apoptosi più lenta che permette la riparazione e rigenerazione del tessuto.

Se i meccanismi sopra descritti avvengono in maniera incontrollata, possono condurre a gravi ripercussioni: una eccessiva o ritardata apoptosi leucocitaria può danneggiare la normale

risposta immunitaria, l'apoptosi di numerose cellule parenchimali può condurre alla disfunzione d'organo e una migrazione difettosa di macrofagi e linfociti può favorire la persistenza dello stato infiammatorio, se avviene in maniera ritardata, oppure, se risulta eccessiva, può portare ad uno stato di minore o assente risposta immunitaria (Bellingan, 2003).

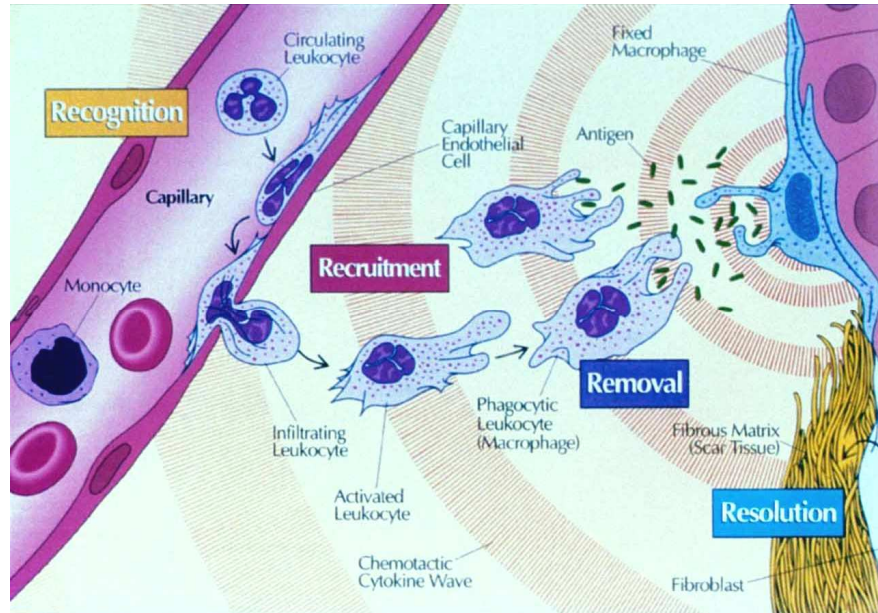


Fig. 1.4 Le quattro “R” del processo flogistico.

1.4 RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA

La capacità di attivare ed inattivare il processo flogistico è fondamentale per mantenere l'omeostasi dell'organismo. Il mancato sviluppo di una risposta infiammatoria lascia l'organismo completamente indifeso e consente all'infezione o alla lesione di svilupparsi in maniera incontrollata, mentre uno stato infiammatorio persistente può risultare pericoloso per la sopravvivenza, poiché conduce ad un aumento generalizzato del metabolismo cellulare con danno tissutale legato soprattutto al rilascio di radicali liberi (Bellingan, 1999).

Qualsiasi tipo di insulto determina primariamente un'infiammazione locale, nel corso della quale vengono rilasciati mediatori pro-infiammatori con lo scopo di distruggere il tessuto danneggiato, promuovere fattori di crescita tissutale ed eliminare microrganismi o altri agenti di flogosi. Tale reazione dà il via, nell'arco di 4-6 ore dal momento dell'insulto, al processo infiammatorio acuto che è caratterizzato da manifestazioni locali conseguenti a reazioni vascolari con essudazione di plasma e cellule: il rossore e il calore (*rubor* e *calor*) sono secondari alla vasodilatazione e all'aumento del flusso sanguigno, l'edema (*tumor*) è legato all'aumento di permeabilità vasale con fuoriuscita di proteine plasmatiche e infiltrazione di cellule nei tessuti perivascolari, l'origine del dolore (*dolor*) è legata alla "irritazione" dei nervi locali ad opera dei mediatori biochimici e la perdita di funzionalità (*functio laesa*) è conseguente all'alterata anatomia e fisiologia delle cellule del tessuto (Bochsler e Slauson, 2002).

La risoluzione del processo è favorita dall'azione di modulatori della risposta infiammatoria, che operano in modo che i mediatori liberati non determinino essi stessi un danno ai tessuti. Se i meccanismi di difesa locali non sono sufficienti a correggere il danno o ad eliminare l'infezione, i mediatori infiammatori, in particolare le citochine, vengono prodotti in quantità eccessiva e raggiungono il circolo sistemico portandosi quindi in sedi lontane dall'originario sito di flogosi. La presenza di fattori pro-infiammatori in circolo funge da segnale di avvertimento che a livello del focolaio infiammatorio l'insulto originario non può essere controllato. Tali mediatori determinano l'attivazione sistemica del sistema immunitario innato e favoriscono il reclutamento di cellule infiammatorie e l'attivazione dell'endotelio.

Si è parlato di "tempesta citochinica" per indicare questa risposta immunitaria incontrollata, caratterizzata da un feed-back positivo tra citochine e cellule immunitarie, in grado di provocare un significativo danno ai tessuti dell'ospite (Matsuda e Hattori, 2006). Dall'attivazione esuberante della risposta innata deriva infatti una massiva reazione sistemica contraddistinta da ipotensione, alterazione della temperatura corporea, tachicardia e depressione del sensorio che caratterizzano la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) (Bone *et al.*, 1997). Questi segni clinici originano da diverse modificazioni fisiopatologiche dovute all'attivazione generalizzata e interdipendente del processo infiammatorio e coagulativo. In particolare, l'endotelio svolge un ruolo chiave nell'avvio, nella perpetuazione e nella modulazione della risposta dell'ospite grazie alla produzione di fattori regolatori sia dell'infiammazione che della coagulazione. L'attivazione dell'endotelio, a livello di microcircolo conduce a diverse modificazioni funzionali: alterazione dell'emostasi, aumento dell'adesione cellulare e della movimentazione leucocitaria, alterazione del tono vasomotore, perdita della funzione di barriera e morte cellulare programmata (Aird, 2003).

La SIRS viene generalmente controbilanciata dall'intervento di molteplici azioni di tipo modulatore messe in atto dall'organismo, che rappresentano nel loro complesso quella che viene definita "sindrome da risposta anti-infiammatoria compensatoria sistemica", identificata

dall'acronimo anglosassone CARS. Il raggiungimento di un equilibrio tra le due risposte, che si sintetizza nella cosiddetta "sindrome da risposta anti-infiammatoria mista" (MARS), è in grado di ricondurre l'organismo all'omeostasi.

Se, diversamente, l'equilibrio viene perso a favore di una delle due componenti della risposta infiammatoria (SIRS vs CARS), si va incontro ad una grave alterazione dell'omeostasi (compromissione cardiovascolare, apoptosi, disfunzione organica, paralisi immunitaria, **(Fig. 1.5)**), la quale, se non viene prontamente ristabilita, può portare ad una condizione irreversibile di disfunzione multiorganica (sindrome da disfunzione multiorganica, MODS) (Bone *et al.*, 1997). I meccanismi in grado di determinare l'evoluzione verso la suddetta sindrome di disfunzione organica non sono ancora del tutto chiariti, anche se alcune teorie chiamano in causa i seguenti meccanismi: traslocazione batterica, danno da ischemia-riperfusion e teoria del "secondo attacco".

La teoria della traslocazione batterica si riferisce alla capacità dei batteri presenti nel tratto gastro-enterico di raggiungere il circolo sistemico quando viene persa l'integrità della mucosa intestinale per motivi diversi, quali atrofia o ulcera della mucosa, morte degli enterociti per mancanza di nutrimento, ipovolemia. La diffusione di lesioni endoteliali con conseguente danno epiteliale dovuti all'azione di citochine o altri mediatori infiammatori possono anch'essi portare ad alterazioni della permeabilità vasale facilitando la traslocazione di batteri che innescano quindi una risposta infiammatoria sistemica. La disfunzione microbiologica ed immunologica del tratto gastro-intestinale funge quindi da fonte secondaria dello stimolo che induce e perpetua la MODS (Balk, 2000).

Il danno da ischemia-riperfusion interviene in seguito al ripristino della perfusione di un tessuto dopo un periodo variabile di ischemia dello stesso. Nel corso di quest'ultima fase si ha un accumulo nell'area ischemica di sostanze (ipoxantina, xantina-ossidasi, etc.), che forniscono il substrato per la successiva formazione di sostanze altamente citotossiche, quali le specie reattive dell'ossigeno (ROS), una volta ristabilita la perfusione ed il conseguente apporto di ossigeno nell'area. L'imponente produzione dei ROS supera la capacità di difesa antiossidante dell'organismo determinando una condizione di stress ossidativo, caratterizzata da gravi disfunzioni fino alla morte cellulare (McMichael *et Moore*, 2004).

La teoria del "secondo attacco" si fonda sull'ipotesi che un insulto primario di diversa natura (trauma, shock, etc.) sia in grado di sensibilizzare i sistemi immunitario, vascolare e infiammatorio, in modo tale che un secondo insulto, anche se di minor intensità, possa provocare una risposta esagerata da parte dell'ospite, caratterizzata da un massivo rilascio di citochine pro-infiammatorie, che determinano una grave instabilità emodinamica (Johnson *et al.*, 2004).

La MODS può anche derivare dal collasso delle funzioni d'organo indotta dall'apoptosi di cellule parenchimali e dell'endotelio della microvascolatura, dall'inattivazione dei macrofagi e dalla "anergia" dei linfociti T mediata dalle citochine. Tali processi, che si instaurano originariamente con l'intento di modulare la risposta infiammatoria, prendono in questo caso il sopravvento inducendo un grave stato di immunodepressione, definito "immunoparalisi", che favorisce lo sviluppo di infezioni secondarie od opportunistiche. Le cellule apoptotiche inducono infatti uno stato di anergia, contrariamente a quanto visto per le cellule necrotiche, che determinano una stimolazione del sistema immunitario favorendo lo sviluppo di difese verso i microrganismi (Hotchkiss *et Karl*, 2003).

Cellule linfatiche, endoteliali e parenchimali possono andare incontro ad apoptosi attraverso tre meccanismi diversi, che conducono tutti all'attivazione di enzimi proteolitici detti *caspasi*, responsabili della morte della cellula. Il primo meccanismo è noto come "via estrinseca" ed è conseguente all'interazione tra una molecola solubile, *Fas ligand*, ed il proprio recettore Fas

presente in una varietà di cellule immunitarie (linfociti B e T, timociti, monociti/macrofagi) e non (epatociti, miocardiociti, pneumociti). A seguito di questo legame, vengono attivate una serie di molecole intracitoplasmatiche capaci di indurre la cascata delle caspasi. La via “intrinseca” è invece indotta da fattori diversi, quali citochine (TNF, IL-1, IL-6), steroidi, ossido nitrico e radicali ossigeno in grado di determinare il rilascio da parte dei mitocondri di varie molecole, in particolare il citocromo c, a cui segue l’attivazione delle caspasi. L’ultimo meccanismo è ancora poco chiaro e sembrerebbe dovuto all’attivazione delle caspasi in seguito al rilascio di calcio da parte del reticolo endoplasmatico e allo stress ossidativo (Wesche-Soldato *et al.*, 2007).

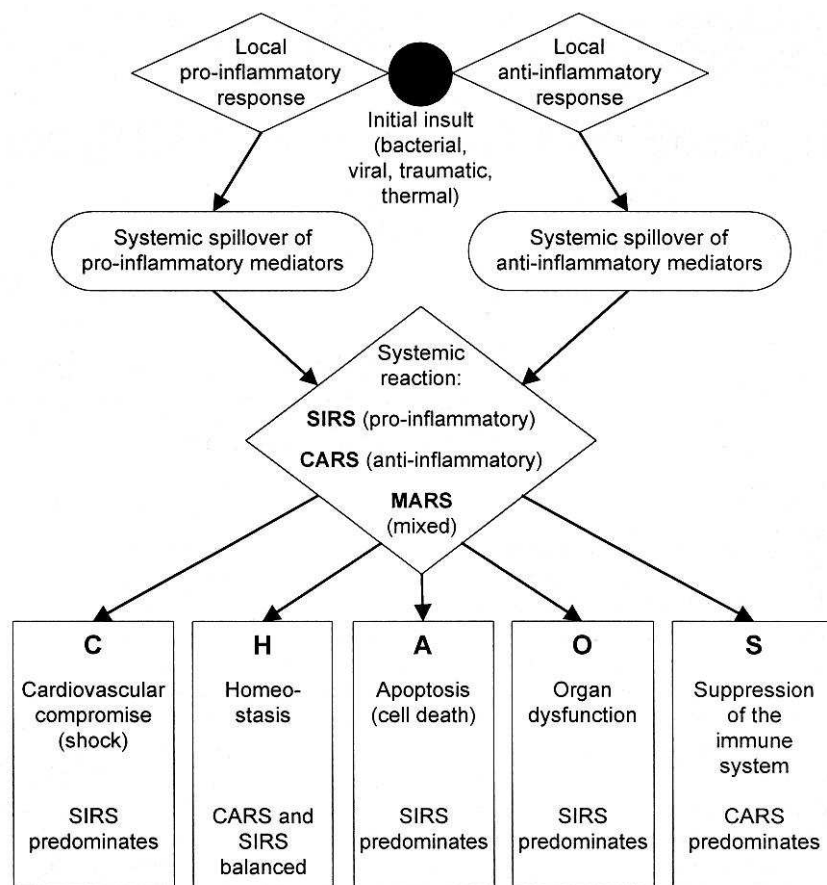


Fig. 1.5 Risposta infiammatoria locale e sistemica (Bone *et al.*, 1997).

1.5 CLASSIFICAZIONE SIRS E SEPSIS

Lo stato fisiopatologico della sindrome da risposta infiammatoria sistemica è stato ampiamente studiato ed è una condizione che si verifica in conseguenza di numerose patologie: infezioni, pancreatite, ischemia, ustioni, traumi, shock emorragico, patologie immuno-mediate, neoplasie (**fig. 1.6**). Quando tale sindrome si verifica a seguito di un'infezione viene definita Sepsis (Bone *et al.*, 1997). Quest'ultima rappresenta una delle principali cause di mortalità nelle unità di terapia intensiva moderne, nonostante il continuo sviluppo di strategie terapeutiche innovative. Attualmente, l'istituzione precoce di un'aggressiva terapia di supporto rappresenta lo strumento più efficace per giungere ad un esito favorevole della malattia, evidenziando la necessità di pervenire ad una diagnosi in tempi rapidi. Partendo da questi presupposti, nel 1991 l'*American College of Chest Physicians* e l'*American Society of Critical Care Medicine* organizzarono una conferenza con l'obiettivo di fornire un quadro teorico e pratico per definire la risposta infiammatoria sistemica ad un'infezione, cioè un processo progressivo e dannoso che ricadeva nel concetto generale di Sepsis. La mancanza di una terminologia e di una classificazione definite ed ampiamente condivise nell'inquadramento della Sepsis rendeva, tra le altre cose, più complessa l'analisi dei risultati dei diversi *trial* clinici, che erano influenzati dalla presenza di popolazioni oggetto di studio non omogenee (Riedemann *et al.*, 2003). Vennero dunque proposte precise definizioni di varie condizioni cliniche relative alla Sepsis, tra cui la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) e la sindrome da disfunzione organica multipla (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS), che rappresentarono un primo tentativo di stratificare la popolazione e fornire elementi utili ai fini di una valutazione diagnostica e prognostica (**tab. 1.2**).

<i>Infezione</i>	processo patologico provocato dall'invasione di un tessuto "sterile", un fluido, una cavità corporea da parte di microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni.
<i>Batteriemia</i>	presenza di batteri vivi in circolo.
<i>Sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS)</i>	manifestazione clinica dell'attivazione sistemica della risposta immunitaria innata, indipendentemente dalla causa.
<i>Sepsis</i>	risposta infiammatoria sistemica ad una infezione causata da batteri, virus, protozoi o miceti.
<i>Sepsis grave</i>	sepsi associata a disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione. Le manifestazioni cliniche includono acidosi lattica, oliguria ed alterazione dello stato mentale.
<i>Shock settico</i>	sepsi in cui è presente una ipotensione refrattaria alla rianimazione mediante fluidoterapia.
<i>Sindrome da disfunzione organica multipla (MODS)</i>	l'alterazione delle funzioni di diversi organi tali da non poter mantenere l'omeostasi senza intervento.

Tab. 1.2 Definizioni di SIRS, Sepsis e MODS (Bone *et al.* 1992).

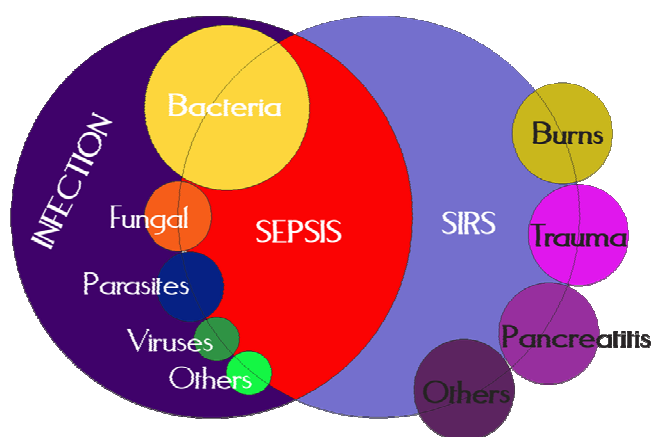


Fig. 1.6 Relazione tra SIRS, Sepsis ed infezione (Bone *et al.*, 1992).

Nell'uomo, si considera la presenza di SIRS quando un paziente presenta due o più dei seguenti parametri clinici (**tab. 1.3**):

Frequenza cardiaca	>90/min
Frequenza respiratoria	>20/min o PaCO ₂ <32 mmHg
Temperatura	>38C° o <36C°
Leucociti	>12000/μl o <4000/μl

Tab. 1.3 Parametri clinici di SIRS nell'uomo (Bone *et al.*, 1992).

Queste definizioni e criteri clinici sono stati ampiamente utilizzati nella pratica e sono serviti come base per numerosi studi clinici. La scarsa sensibilità e specificità di tali parametri e la mancanza di un reale “gold standard” per la diagnosi di Sepsis ha reso però necessaria una revisione dei criteri stabiliti, anche nell’ottica di una gestione mirata dei pazienti affetti da tale sindrome. Nonostante l’identificazione di nuovi e promettenti approcci terapeutici, attualmente, per garantire una maggiore efficacia nella riduzione della mortalità conseguente alla disfunzione multiorganica secondaria alla Sepsis, è fondamentale pervenire precocemente ad una diagnosi del processo morboso in atto, considerata l’inefficacia anche delle terapie più specifiche, se iniziate tardivamente. Parimenti, la necessità di un pronto intervento, oltre ad avere la finalità di prevenire le gravi sequele e complicanze legate all’evoluzione sfavorevole della sindrome in oggetto, è volta ad accorciare i tempi di ospedalizzazione e ridurre i rilevanti costi economici necessari per la gestione di suddetti pazienti critici.

L’esame potenzialmente più specifico per arrivare alla diagnosi di Sepsis in presenza di un sospetto clinico sarebbe quello della coltura microbiologica (emocoltura). Tale procedura, però, richiede almeno 24-48 ore di tempo per poter evidenziare la crescita del microorganismo e l’incidenza di false negatività risulta elevata (Mitaka, 2005).

La necessità di migliorare le definizioni correnti e di identificare metodologie per aumentare l’accuratezza, l’attendibilità e l’utilità clinica della diagnosi di Sepsis portò all’istituzione di una seconda conferenza internazionale nel 2001. Nel corso di tale conferenza, dato il frequente

riscontro in diversi studi di parametri clinici e laboratoristici in pazienti che rispondevano ai criteri di SIRS stabiliti nel 1991, venne stilata una lista più completa di possibili variabili (infiammatorie, emodinamiche, d'insufficienza d'organo), che meglio riflettevano la risposta all'infezione o ad altri insulti (**tab. 1.4**) (Levy *et al.*, 2001). In questo contesto l'utilizzo di indicatori biologici o *biomarker*, ossia fattori misurabili nel sangue o in campioni biologici in grado di identificare o studiare la patologia in oggetto, ha trovato una crescente applicazione ed un favorevole riscontro. Un marker ideale dovrebbe garantire una diagnosi precoce, fornire indicazioni sull'andamento della patologia e soprattutto consentire di formulare una prognosi. A tutt'oggi, un unico accurato indicatore biochimico diagnostico e prognostico di Sepsis non è stato ancora individuato, vista anche la complessità, l'eterogeneità e la conoscenza ancora parziale dei processi che stanno alla base di suddetta sindrome. Ciononostante, diversi biomarker vengono attualmente impiegati nella pratica clinica avendo dimostrato la loro utilità e la loro superiorità nei confronti dei reperti clinici e dei test convenzionali.

Criteri per la diagnosi di Sepsis

variabili generali:

febbre (temperatura >38,3°C) o ipotermia (temperatura <36°C)
 frequenza cardiaca > 90/min o > 2 SD rispetto al valore normale per l'età
 tachipnea
 alterazione dello stato mentale
 edema significativo
 iperglicemia (glicemia > 120 mg/dl in assenza di diabete)

variabili infiammatorie:

leucocitosi (>12.000 cellule/ml) o leucopenia (<4000 cellule/ml)
 conta leucocitaria nella norma ma con più del 10% di forme immature
 proteina C reattiva plasmatica > 2 SD rispetto al valore normale
 procalcitonina plasmatica >2 SD rispetto al valore normale

variabili emodinamiche:

ipotensione arteriosa (P.sistolica <90mmHg, P.art.media <70mmHg o calo della P.sistolica di 40mmHg negli adulti o di 2 SD inferiore al valore normale per l'età)
 saturazione dell'ossigeno (sangue misto) >70%
 indice cardiaco >3,5L/min/M

variabili legate a disfunzione d'organo:

ipossiemia arteriosa (PaO₂/FiO₂ <300)
 oliguria acuta (output urinario <0,5ml/kg/ora)
 creatinina >0,5mg/dl
 alterazioni del profilo coagulativo (INR>1,5 o aPTT >60secondi)
 ileo paralitico
 trombocitopenia (<100.000/ml)
 iperbilirubinemia (>4mg/dl)

variabili legate alla perfusione tissutale:

iperlattatemia (>1mmol/L)
 riduzione del tempo di riempimento capillare

Tab. 1.4 Criteri per la diagnosi di Sepsis (Levy *et al.*, 2001).

Venne poi evidenziato come le definizioni di Sepsis, Sepsis grave e shock settico non consentivano una precisa stadiazione dei pazienti e la formulazione di una prognosi. Prendendo spunto dal sistema TNM, utilizzato in oncologia per stadiare i tumori maligni in relazione a: tumore primario (T), metastasi ai linfonodi loco-regionali (N) e metastasi a distanza (M) (Sobin, 2001), venne proposto un sistema di stadiazione clinica per poter suddividere i pazienti in base alla loro predisposizione a sviluppare patologie e la loro potenziale risposta alla terapia. Questo sistema, denominato “**PIRO**” (*Predisposing conditions, Insult, Response of the host*,

Organ dysfunction), classifica i pazienti in base alle loro condizioni predisponenti a sviluppare la patologia (P), alla natura e all'estensione dell'insulto (I), al tipo di risposta (R) ed al grado di disfunzione d'organica (O) (Levy *et al.*, 2003).

Per **predisposizione** si intende la presenza di fattori genetici o patologie preesistenti che rendono il paziente più suscettibile allo sviluppo di Sepsis. Ad esempio, uno stato di immunosoppressione può incrementare il rischio di sviluppo di infezioni e diminuire l'entità della risposta infiammatoria, mentre il polimorfismo genetico dell'allele TNF2 può comportare una potente ed esuberante risposta infiammatoria, che risulta dannosa per l'organismo.

Il sito, il tipo e l'estensione dell'**infezione** hanno un significativo impatto sull'evoluzione della Sepsis e dello shock settico e quindi sulla prognosi (Levy *et al.*, 2003). La "T" del sistema PIRO indica quella componente della Sepsis che risponde alla terapia antibiotica ed equivale alla "T" del sistema TNM che descrive l'aspetto del tumore che può essere trattato chirurgicamente (Marshall *et al.*, 2003).

La **risposta** dell'ospite è di fondamentale importanza per la protezione del paziente, ma se si realizza in maniera inappropriata può risultare deleteria. La caratterizzazione di quest'ultima da un punto di vista quali-quantitativo rappresenterebbe un utile ausilio diagnostico e prognostico nella gestione di un paziente critico. L'utilizzo dei cosiddetti *biomarker* fornisce un contributo importante in questo contesto. Il marker ideale dovrebbe essere altamente sensibile e specifico, facilmente misurabile e poco costoso. In aggiunta, dovrebbe consentire di classificare i pazienti in base alla presenza o meno della patologia, di identificare un processo nel momento in cui un intervento terapeutico può alterarne la progressione e di fornire informazioni riguardo alla risposta alla terapia instaurata per poterla in caso modificare (Marshall *et al.*, 2003).

Le molecole che sono più comunemente studiate come possibili marker sono quelle rilasciate in circolo in risposta alla SIRS, quindi citochine, proteine di fase acuta, ormoni dello stress, fattori endocrini e molecole intracellulari. In particolare, fra le molecole che sono state proposte come marker vi sono la proteina C reattiva (CRP), l'interleuchina 6 (IL-6) e più recentemente una proteina chiamata procalcitonina (PCT) (Levy *et al.*, 2001).

L'ultima voce del sistema PIRO è rappresentata dalla **O**, che definisce la presenza e soprattutto l'estensione della **disfunzione d'organo**, che, analogamente alla presenza di metastasi nei tumori maligni, influisce in senso negativo sulla prognosi (Levy *et al.*, 2003). Un monitoraggio seriale del paziente tramite indicatori di funzionalità d'organo, nell'ambito di sistemi di punteggio specificatamente disegnati, fornisce da un lato informazioni prognostiche e dall'altro garantisce un intervento precoce e diretto nei confronti di processi insorti più tardivamente, quali coagulopatie ed insufficienza surrenalica (Marshall *et al.*, 2003). Diversi sistemi di punteggio sono stati proposti per definire meglio la disfunzione d'organo e per poter valutare criteri più oggettivi per formulare una prognosi. Esempi sono il SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), il MODS (*Multiple Organ Dysfunction Score*) e l'APACHE (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*). Tali sistemi assegnano per ciascun organo un punteggio basato sul grado di compromissione delle funzioni dell'organo stesso. La rilevazione di un aumento dei punteggi può indicare l'imminenza dello sviluppo di MODS e permette di instaurare il più rapidamente possibile una terapia aggressiva di supporto che risulta attualmente lo strumento più efficace per incrementare la sopravvivenza (Johnson *et al.*, 2004).

1.6 MARKER DI SIRS/SEPSIS

Ci sono due approcci per il monitoraggio biochimico ed immunologico: si possono studiare i fluidi corporei, in particolare il plasma, o le cellule, generalmente quelle ematiche.

1.6.1 MARKER PLASMATICI

- *Induttori della Sepsis*

1.6.1.1 Endotossine

Il lipopolisaccaride, o endotossina, è una componente della parete cellulare dei batteri Gram negativi. Se ne riconoscono tre porzioni, elencate nell'ordine, partendo dall'esterno verso l'interno della cellula:

- una catena polisaccaridica, composta da sequenze oligosaccaridiche ripetute che, essendo diverse in ogni batterio, sono responsabili della specificità antigenica degli stessi e dell'induzione alla produzione di anticorpi (si parla di *antigene somatico* o *antigene "O"*);
- un core polisaccaridico a composizione costante in tutti i batteri;
- il lipide A, un glicofosfolipide responsabile dell'attività tossica (Abbas *et al.*, 2000).

La misurazione del LPS circolante presenta diversi ostacoli: il test che si utilizza (*Limulus amoebocyte lysate test*) mostra problemi metodologici e bassa specificità a causa della diversità strutturale delle endotossine e alle interazioni con proteine plasmatiche e antibiotici, che conducono a risultati disomogenei nei vari studi clinici effettuati (Reinhart *et al.*, 2006). Una singola misurazione del LPS può essere ingannevole, poichè spesso i batteri/LPS sono presenti transitoriamente nel circolo sanguigno. Alcuni studi mostrano come il livello di LPS nel plasma sia direttamente collegato alla percentuale di non sopravvivenza (Opal *et al.*, 1999). Recenti studi si sono focalizzati sulla ricerca della LPS binding protein (LBP), proteina di fase acuta capace di legare LPS, e di anticorpi anti-LPS: i livelli di LBP risultano inferiori nei pazienti non sopravvissuti e bassi valori anticorpali sono associati ad un aumento della mortalità (Strutz *et al.*, 1999).

- *Prodotti delle cellule*

1.6.1.2 Citochine

Vengono di seguito brevemente descritte le caratteristiche delle citochine maggiormente coinvolte nella risposta SIRS/Sepsis. Ognuna di queste verrà poi ripresa in maniera più esauriente nel capitolo 2.

Interleuchina 1 beta (IL-1 β)

L'interleuchina 1 beta, all'inizio descritta come la molecola capace di indurre la febbre, è un peptide di circa 15 KDa. E' prodotta soprattutto dai monociti/macrofagi, ma anche da cellule dendritiche, neutrofili, linfociti T e B, cellule endoteliali, cheratinociti, fibroblasti, astrociti e cellule della microglia. E' codificata da due geni che danno origine a due proteine che agiscono sullo stesso recettore e differiscono solo per il punto isoelettrico, α e β . IL-1 α è una citochina associata alle cellule che può anche agire da fattore di trascrizione, mentre IL-1 β viene secreta in circolo e perciò è più probabile che svolga un ruolo nella risposta infiammatoria sistemica.

Non c'è evidenza di un ruolo di questa citochina in condizioni fisiologiche, mentre è chiaro che agisca come iniziatore e regolatore della risposta infiammatoria ed immunitaria. IL-1 β è in grado di indurre l'attivazione di molecole che permettono la trascrizione di diversi geni non codificati nell'individuo sano. Ad esempio, induce l'espressione della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) e dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS), che inducendo la sintesi di ossido nitrico contribuisce al calo delle resistenze vascolari. Una volta entrata in circolo, si lega ai recettori presenti nei vasi ipotalamici determinando la sintesi della COX-2 che a sua volta induce un aumento dei livelli di prostaglandina E2 (PGE2). Quest'ultima attiva il centro ipotalamico della termoregolazione portando alla comparsa di febbre. Nel circolo periferico, IL-1 β attiva i recettori endoteliali così da permettere l'espressione di molecole di adesione e delle chemochine che facilitano la migrazione dei neutrofili verso i tessuti. Questa interleuchina, inoltre, amplifica l'espressione di altre citochine, quali TNF- α e IL-6. A livello di midollo osseo, l'IL-1 β determina un aumento delle cellule progenitrici mieloidi promuovendo il rilascio di neutrofili con conseguente neutrofilia, tramite la produzione di Colony Stimulating Factors, GM-CSF, e provoca una riduzione della risposta all'eritropoietina conducendo ad uno stato di anemia (Dinarello, 2005).

La somministrazione di IL-1 in diversi animali da laboratorio si è mostrata in grado di indurre lo sviluppo di ipotensione, aumento della gittata e della frequenza cardiaca, leucopenia, trombocitopenia, emorragie ed edema polmonare (Van der Poll e Van Deventer, 1999).

IL-1 β è stata rilevata nel plasma di pazienti settici ad elevati livelli, mentre IL-1 α non è stata mai osservata.

IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) è un inibitore naturale dell'IL-1, è prodotto da diverse cellule tra cui i monociti/macrofagi ed anche dagli epatociti come proteina di fase acuta. Questa molecola è normalmente presente nel plasma degli individui sani ed aumentati livelli sono riscontrabili nei pazienti settici. Dato che si tratta di un antagonista, la sua concentrazione deve essere almeno 100 volte superiore a quella dell'IL-1 per poterne bloccare gli effetti, ma negli studi effettuati le concentrazioni rilevate sono molto più elevate (Gardlund *et al.*, 1995). Il trattamento precoce in medicina umana con IL-1ra si è mostrato in grado di diminuire la mortalità in corso di shock endotossico ed altre condizioni di infiammazione sistemica (Dinarello, 2005). La descrizione di IL-1 verrà ripresa nei capitoli successivi.

↳ Interleuchina 6 (IL-6)

L'interleuchina 6 è una citochina prodotta da monociti/macrofagi, cellule endoteliali e fibroblasti che interviene nella regolazione della reattività immunitaria, nella risposta di fase acuta, nell'oncogenesi e nella ematopoiesi. Il ruolo fisiologico dell'IL-6 appare limitato: induce la sintesi del Neuronal Growth Factor (NGF), dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) a livello ipofisario e regola la crescita e lo sviluppo delle cellule ematopoietiche e delle cellule staminali embrionali.

Nell'individuo adulto sano le concentrazioni plasmatiche sono inferiori a 10 pg/ml, mentre i neonati presentano concentrazioni di 18-26 pg/ml, che poi decrescono progressivamente nei primi 5 anni di vita.

L'IL-6 presenta un insolito meccanismo di attivazione cellulare dato che il suo recettore presenta solo un piccolo dominio intracitoplasmatico, che manca di qualsiasi capacità traduttrice di segnale e sembra avere la stessa funzione di una proteina solubile. Il complesso tra IL-6 ed il suo recettore si lega a due glicoproteine, gp 130, che permettono l'attivazione della cascata delle chinasi, che a sua volta contribuiscono all'attivazione di un gran numero di proteine di fase acuta, incluse altre citochine con proprietà infiammatorie. La gp 130 è un trasduttore del segnale citochinico, che può essere attivata anche da IL-11, dal fattore leucemia inibente, dall'oncostatina M, dal fattore ciliare neurotrofico e dalla cardiotrofina-1. In assenza di gp 130, IL-6 risulta essenzialmente inerte.

La presenza di elevati livelli plasmatici di IL-6 in corso di batteriemia è documentata in diversi studi. La sua produzione è rapidamente indotta nel corso di una risposta infiammatoria acuta: la somministrazione di endotossina in volontari ha mostrato un picco plasmatico di IL-6 dopo 2 ore. Il rilascio di questa citochina è stimolato da TNF- α e IL-1, ma persiste nel plasma molto più a lungo rispetto a queste due molecole, per questo può essere considerata un marker dell'attivazione della risposta citochinica pro-infiammatoria. Fattori che ne inibiscono la sintesi sono IL-4 e IL-13 (Song *et Kellum*, 2005).

L'infusione di IL-6 in soggetti volontari si è mostrata in grado di indurre lievi segni clinici, quali la comparsa di febbre e brividi, a differenza dei gravi effetti sistemici rilevabili a seguito della somministrazione di IL-1 e TNF (Van der Poll *et Van Deventer*, 1999).

Numerosi studi hanno evidenziato una correlazione positiva tra i livelli plasmatici di IL-6 in pazienti settici al momento dell'ammissione ed il tasso di mortalità e la valutazione di questa singola citochina si è rivelata un indice prognostico piuttosto accurato. Concentrazioni costantemente elevate sembrano più importanti del valore rilevato all'ammissione o del picco ematico raggiunto nel prevedere la sopravvivenza (Fraunberger *et al.*, 2006).

Recenti studi condotti sul topo hanno mostrato che IL-6 è una molecola chiave coinvolta nella disfunzione della barriera intestinale a seguito di shock emorragico e rianimazione (Yang *et al.*, 2003) e riveste poi un ruolo importante nell'attivazione della cascata coagulativa in corso di Sepsis (Song *et Kellum*, 2005).

In vari modelli sperimentali di Sepsis, fra cui primati non umani, si è evidenziata l'efficacia della somministrazione di anticorpi anti IL-6. Al contrario, studi effettuati su un modello di Sepsis nel topo, ha mostrato un miglioramento dei tassi di sopravvivenza a seguito della somministrazione di IL-6 e una rapida mortalità a seguito dell'inibizione di questa citochina (Mancuso *et al.*, 1994). In un altro modello sviluppato in topi knock-out per IL-6, non si sono evidenziate significative differenze nei tassi di mortalità rispetto a topi wild-type (Remick *et al.*, 2005).

IL-6 viene considerata una citochina capace di effetti non solo proinfiammatori, ma anche anti-infiammatori. Questi ultimi sono legati al riscontro in più studi clinici che tale citochina è in grado di inibire la produzione in vitro di IL-1 e TNF da parte di cellule mononucleate stimulate con LPS e in vivo in modelli di endotossiemia nel topo. Inoltre, IL-6 induce un aumento dei livelli plasmatici dei recettori solubili del TNF e IL-1ra, inibitori naturali delle due citochine (Van der Poll *et Van Deventer*, 1999).

D'altra parte, più studi mostrano come IL-6 rappresenti una componente importante della risposta contro agenti infettivi, quali batteri Gram negativi e parassiti intracellulari, ed è necessaria per un adeguato controllo dell'infezione, nonché per altre importanti funzioni quali la regolazione della temperatura corporea e dell'attività metabolica (Remick *et al.*, 2005). La descrizione di IL 6 verrà ripresa nei capitoli successivi.

↳ **Interleuchina 8 (IL-8)**

L'interleuchina 8 rappresenta il prototipo delle chemochine, molecole in grado di indurre chemiotassi e quindi di richiamare cellule nel sito di infiammazione. Viene prodotta da una vasta varietà di tipi cellulari, ma la principale fonte è rappresentata dai monociti/macrofagi. Diversi stimoli ne inducono la sintesi e fra questi ci sono: LPS, batteri ed anche citochine quali TNF- α e IL-1. Una volta prodotta, l'IL-8 persiste a lungo in circolo (giorni o anche settimane) con lo scopo di richiamare cellule infiammatorie per combattere l'infezione batterica. Si tratta di una piccola proteina molto resistente ad alterazioni di temperatura, alla proteolisi e piuttosto resistente a condizioni di acidità. Queste caratteristiche la rendono una molecola ideale per sopravvivere nel sito di flogosi. Nella regolazione dell'espressione genica dell'IL-8 interverrebbero anche fattori ossidanti, quali le specie reattive dell'ossigeno, che vengono liberate in eccesso in seguito al danno da riperfusion (Remick, 2005). In corso di Sepsis, è rilevabile un elevato livello plasmatico di IL-8 non solo come molecola libera, ma anche nella forma associata ai leucociti. Il primo incontro tra IL-8 e i neutrofili determina una desensibilizzazione di questi ad ulteriori segnali rilasciati localmente dall'IL-8. Per questo, la presenza di questa chemochina nello spazio vascolare potrebbe essere un meccanismo per limitare l'accumulo di neutrofili come dimostrato dalla diminuita migrazione di tali cellule negli stati di endotossimia e Sepsis (Marie *et al.*, 1997). La descrizione di IL 8 verrà ripresa nei capitoli successivi.

↳ **Interleuchina 10 (IL-10)**

IL-10 viene secreta da diverse cellule tra cui linfociti T, monociti/macrofagi, cellule dendritiche e cellule epiteliali. E' capace di regolare il processo flogistico inibendo la produzione di citochine pro-infiammatorie, come IL-12, da parte dei linfociti T helper 1 e di molecole pro-infiammatorie quali TNF- α , IL-1 β , IL-8 e ossido nitrico da parte dei monociti/macrofagi. Il maggior stimolo alla sua produzione è l'infiammazione stessa attraverso la secrezione di TNF e IL-1, suggerendo l'esistenza di un feed-back negativo nella regolazione della risposta infiammatoria. Svolge quindi un ruolo fondamentale nella risoluzione della flogosi, ma se presente in quantità eccessiva può anche contribuire allo sviluppo di uno stato di immunosoppressione caratterizzato da deficit delle cellule presentanti l'antigene, anergia dei macrofagi, diminuita proliferazione dei linfociti T helper 1 ed aumento dell'apoptosi di linfociti T e B.

Diversi studi mostrano come la concentrazione di IL-10 sia elevata nel plasma di pazienti settici e i livelli riscontrati sembrano direttamente correlati alla gravità della risposta infiammatoria nonché alla concentrazione di citochine pro-infiammatorie come TNF- α (Scumpia e Moldawer, 2005). La descrizione di IL 10 verrà ripresa nei capitoli successivi.

↳ Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

L'indagine mirata ad individuare la causa di necrosi emorragica in corso di tumori ha portato alla scoperta del fattore di necrosi tumorale, TNF- α , così chiamato per distinguerlo dal TNF- α o linfotossina α che si lega al medesimo recettore.

TNF- α è una proteina che esiste sia in forma solubile che in una forma transmembrana ed è prodotta principalmente da macrofagi in risposta a vari stimoli infiammatori, ma anche da linfociti, cellule natural killer e altre cellule non ematopoietiche (fibroblasti, epatociti, cellule epiteliali). Notevoli quantità di TNF sono poi immagazzinate nei granuli dei mastociti. Si tratta di una citochina ad attività tossica (citotossina), in grado di uccidere altre cellule.

A basse concentrazioni, TNF agisce localmente per regolare l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali, neutrofili, macrofagi e linfociti, favorendo il passaggio dei leucociti nel tessuto che ha subito il danno. TNF induce la produzione di citochine, in particolare IL-1, IL-6, chemochine, IFN e TNF stesso da parte dei macrofagi attivati.

A concentrazioni moderate, TNF passa in circolo producendo effetti sulle cellule dell'intero organismo. Come IL-1, promuove la comparsa di febbre e favorisce la produzione delle proteine di fase acuta ad opera degli epatociti. Il TNF aumenta inoltre la sintesi di IL-1 e IL-6 da parte dei macrofagi, originando una cascata citochimica, promuove la coagulazione, i processi di riparazione vascolare e la proliferazione dei fibroblasti per la riparazione tissutale.

Alte concentrazioni sistemiche sono potenzialmente letali per i suoi effetti metabolici e di alterazione circolatoria (Mak e Saunders, 2006).

Nel 1987 fu dimostrata per la prima volta l'associazione tra alti livelli sierici di TNF- α e mortalità in pazienti con meningite da meningococco e tale riscontro è stato evidenziato anche da numerosi studi successivi in pazienti settici. La somministrazione di alte dosi di TNF è capace di indurre i vari effetti deleteri riscontrabili in corso di endotossemia, quali ipotensione, acidosi metabolica, emocoagulazione e morte in minuti o ore. Inoltre, animali, a cui sono state somministrate dosi letali di LPS, hanno mostrato la presenza in circolo di concentrazioni elevate di TNF (Spooner *et al.*, 1992).

A differenza di IL-1, non esiste un recettore naturale antagonista per TNF, ma in circolo sono presenti diversi recettori solubili in grado di legare TNF ed inibirne l'azione. Questi recettori sono rilevabili ad alte concentrazioni nel plasma di pazienti settici (Dinarello, 1997).

Dato il suo potenziale patogeno, è stata considerata l'ipotesi di testare la terapia anti TNF- α quale buona soluzione verso un largo spettro di patologie in modelli animali e in un ristretto numero di studi clinici umani. L'utilizzo di anticorpi anti TNF ha mostrato di ridurre la mortalità in modelli animali di shock endotossico, se somministrati entro un breve periodo dall'iniezione di LPS (Beutler *et al.*, 1985). Trial clinici sviluppati nei diversi anni non hanno mostrato però un aumento significativo dei tassi di sopravvivenza a seguito dell'utilizzo di inibitori di TNF (recettori solubili ed anticorpi neutralizzanti TNF) (Remick, 2007).

Il motivo del fallimento dei diversi studi può essere legato al fatto che TNF è una delle prime citochine prodotte in risposta ad un insulto infiammatorio e, quando si evidenzia l'alterazione dello stato clinico, è già stata innescata la cascata citochinica che prende avvio dal TNF stesso. Per questo motivo, la terapia "anti-citochina" è ora maggiormente orientata sulla possibilità di utilizzo di molecole neutralizzanti mediatori prodotti in un momento successivo rispetto al TNF (Clark, 2007). La descrizione di TNF verrà ripresa nei capitoli successivi.

1.6.1.3 Procalcitonina

La procalcitonina (PCT), pro-ormone della calcitonina (CT), scoperta nel 1975 da Moya nell'uomo, è uno dei *biomarker* che ha destato maggiore interesse negli ultimi anni. La PCT, polipeptide di 116 amminoacidi e peso molecolare di 13 KDa, viene sintetizzata nelle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide e in alcune cellule neuroendocrine polmonari, all'interno delle quali subisce un clivaggio enzimatico originando l'ormone maturo CT (32 AA), coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi del calcio.

I livelli circolanti di PCT sono riportati al di sotto della soglia di rilevamento analitico negli individui sani. Tuttavia, nei primi anni '90, si evidenziarono per la prima volta elevati livelli plasmatici di PCT in corso di Sepsis (Assicot *et al.*, 1993). L'evidenza in diversi studi successivi che i livelli ematici di PCT risultino migliaia di volte (fino a 100.000) più elevati del normale in corso della suddetta sindrome ha incluso a buon diritto tale molecola fra i suoi *biomarker* più accreditati (Christ-Crain e Muller, 2007).

Tali riscontri sono stati supportati dalla dimostrazione di un analogo incremento di PCT nel plasma in soggetti volontari sani dopo somministrazione di endotossina (LPS) in assenza di variazioni significative dei livelli di calcitonina, (Preas *et al.*, 2001). Al contrario, i livelli plasmatici di PCT risultano non rilevabili o solo modicamente aumentati in corso di infezioni batteriche localizzate, infezioni virali e in presenza di una risposta infiammatoria sistemica di natura non infettiva (ad es. traumi, interventi chirurgici, infarti miocardici, malattie autoimmuni, rigetto da trapianto, etc.) (Meisner, 2002). Una ipotesi avanzata è che in queste ultime condizioni l'innalzamento della PCT sia legato a complicazioni di natura settica secondarie ad ipoperfusione della mucosa intestinale con conseguente danno e traslocazione di batteri o loro prodotti in circolo (Brunkhorst *et al.*, 1999). La PCT sembrerebbe quindi un marker capace di discriminare tra cause infettive e non infettive di SIRS con una specificità per le infezioni di origine batterica (Gendrel *et al.*, 1997).

In volontari in cui è stato iniettato LPS, si è visto che la concentrazione di PCT in circolo aumenta nell'arco di 3 ore, raggiunge il picco in 8-24 ore e rimane ad alti livelli per almeno una settimana. La cinetica della PCT si presta particolarmente alla misurazione clinica del processo infiammatorio per la sua rapidità di induzione (circa 6 ore) e per la sua persistenza in circolo (attorno alle 25-30 ore). In corso di infezioni gravi, infatti, i valori plasmatici delle classiche citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α) aumentano solo per un breve periodo o in maniera intermittente (Christ-Crain e Muller, 2007).

Un importante aspetto dell'utilizzo della procalcitonina come marker riguarda la sua stretta associazione con la gravità dello stato infiammatorio, che sembra essere superiore rispetto ad altri indicatori di infiammazione comunemente utilizzati, quali IL-6 e CRP (Oberhoffer *et al.*, 1999). La concentrazione di PCT circolante risulta inoltre correlata alla gravità di disfunzione organica che viene definita da sistemi di punteggio quali "SOFA" (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*) e "APACHE II" (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*) (Meisner, 2002). In aggiunta, la valutazione seriale delle concentrazioni plasmatiche di PCT si è dimostrata un valido strumento nel monitoraggio della progressione dell'infezione e nell'impostazione della terapia antibiotica (Reinhart *et al.*, 2006).

Recenti studi hanno fornito elementi utili a comprendere la fisiopatologia di questa molecola, ma diversi aspetti relativi all'origine, al meccanismo di induzione e alla sua funzione biologica rimangono ancora oscuri.

La PCT appartiene ad una famiglia di proteine tra loro correlate ("CAPA" *protein family*) che comprende l'amilina, l'adrenomedullina, i peptidi correlati al gene della calcitonina (CGRP I e II), la calcitonina ed i suoi precursori.

La calcitonina ed i suoi precursori derivano dalla trascrizione del gene CALC-I presente nell'uomo sul cromosoma 11 in seguito a splicing alternativo dell'RNA messaggero.

Il classico paradigma neuroendocrino limita l'espressione del gene CALC-I alle cellule neuroendocrine (cellule C della tiroide e alcune cellule nel polmone), ma il ritrovamento di

elevate concentrazioni ematiche anche in pazienti tiroidectomizzati ha suggerito un'origine extratiroidea di questo peptide (Linscheid *et al.*, 2004).

Diversi studi hanno dimostrato l'espressione tissutale ubiquitaria del CALC-I in modelli animali di Sepsis come la cavia (Muller *et al.*, 2001), il suino (Wagner *et al.*, 2002) e il babuino (Morgenthaler *et al.*, 2003).

Per questi riscontri, la PCT rappresenta il prototipo di quella che viene definita un'*ormochina*, molecola che può essere sintetizzata nelle cellule endocrine seguendo la via classica ormonale o, a seguito di uno stimolo infiammatorio, può essere prodotta da diversi tipi cellulari, seguendo il comportamento tipico delle citochine (Christ-Crain e Muller, 2007).

I meccanismi che portano ad un'espressione extra-tiroidea del gene CALC-I nell'uomo non sono ancora completamente chiariti, ma studi condotti *in vitro* su diverse linee cellulari umane hanno fornito elementi utili per una migliore comprensione del processo in oggetto.

Dato il loro ruolo chiave come fonte di mediatori infiammatori di fase acuta, i monociti/macrofagi sono stati oggetto di diversi studi riguardo il loro possibile coinvolgimento nella produzione di PCT. L'espressione transitoria (meno di 18 ore) dell'mRNA codificante per la PCT è stata dimostrata *in vitro* in monociti, isolati dal sangue di donatori sani, previa adesione su monostrato di cellule vascolari umane attivate con TNF- α umano (Linscheid *et al.*, 2004). Dati contrastanti esistono invece riguardo l'espressione dello stesso gene da parte di monociti circolanti in corso di Sepsis (Monneret *et al.*, 1999). Un altro studio riferisce la presenza di notevoli quantità di PCT plasmatica in pazienti leucopenici o immunodepressi a seguito di chemioterapia, ipotizzando quindi che i monociti circolanti non siano la maggiore o unica fonte di PCT (Meisner, 2002).

Macrofagi attivati previa stimolazione con citochine, LPS o *Escherichia coli*, mantenuti in coltura con adipociti, hanno mostrato di indurre l'espressione del gene CALC-I in questi ultimi in maniera protratta (più di 24 ore). In aggiunta, citochine quali IL-1 β e TNF- α , sarebbero in grado di potenziare l'induzione dell'RNA messaggero della calcitonina e la produzione di PCT da parte di colture primarie di adipociti umani, mentre l'interferone gamma (IFN- γ) attenuerebbe al contrario i suddetti effetti (Linscheid *et al.*, 2003). Tessuto epatico incubato *in vitro* con citochine pro-infiammatorie (IL-6 o TNF- α) ha mostrato e confermato che il fegato riveste sicuramente un ruolo importante nella produzione di PCT (Meisner *et al.*, 2003).

In corso di Sepsis, l'espressione del gene CALC-I sembrerebbe quindi ascrivibile prevalentemente a cellule degli organi parenchimosi. Tali cellule probabilmente mancano degli enzimi necessari al clivaggio del proormone procalcitonina, che verrebbe di conseguenza liberato direttamente in circolo, e ugualmente non consentirebbero una stoccaggio intracellulare della proteina (Maruna *et al.*, 2000).

Il ruolo fisiopatologico della procalcitonina in corso di Sepsis non è ancora stato chiarito. Da alcuni studi effettuati su modelli animali di Sepsis scaturisce un possibile effetto deleterio della PCT. La somministrazione di PCT esogena ha mostrato di aumentare il tasso di mortalità in un modello di Sepsis nella cavia e, viceversa, una riduzione della mortalità è stata raggiunta mediante somministrazione di anticorpi neutralizzanti la PCT (Nylen *et al.*, 1998). Le limitazioni del suddetto studio sono legate all'esiguità del campione, alla somministrazione di PCT di derivazione umana e all'utilizzo di anticorpi non specifici. Un effetto favorevole secondario alla immunoneutralizzazione della PCT è stato nuovamente dimostrato in termini di miglioramento dei parametri fisiologici e metabolici, nonché della sopravvivenza sul breve periodo, in un modello suino di Sepsis, dove è stato utilizzato un antisiero specifico verso la PCT suina (Wagner *et al.*, 2002). In contrasto con questi dati, studi condotti *in vitro* imputano alla PCT un'azione antinfiammatoria dimostrata da un suo effetto inibitorio verso la produzione di TNF- α da parte di leucociti umani circolanti stimolati con LPS. In aggiunta, la PCT somministrata in una coltura di cellule muscolari lisce vascolari di ratto, incubate con TNF- α /IFN- γ , ha mostrato di inibire la sintesi di un mediatore infiammatorio come l'ossido nitrico. Lo stesso studio, ripetuto aggiungendo la PCT dopo 3 ore dall'induzione dello stimolo

infiammatorio, ha fornito risultati contrapposti al precedente evidenziando un'aumentata espressione del gene iNOS dopo l'applicazione della PCT in coltura (Hoffmann *et al.*, 2001).

1.6.1.4 Proteina C reattiva

La proteina C reattiva (CRP) è una proteina di fase acuta, prodotta dagli epatociti a seguito della stimolazione di mediatori infiammatori quali TNF- α , IL-1, IL-6 ed IL-8, che presenta proprietà sia pro- che anti-infiammatorie: promuove l'attivazione del sistema del complemento dopo aver legato frammenti della membrana cellulare e polisaccaridi batterici, previene l'adesione dei granulociti alle cellule endoteliali e la produzione di radicali superossido e stimola la produzione di IL-1ra (Gabay e Kushner, 1999). La secrezione di CRP inizia entro 4-6 ore dallo stimolo e le concentrazioni plasmatiche raggiungono il picco a 36-50 ore e rimangono elevate per diversi giorni anche a seguito dell'eliminazione della causa (Povoa, 2002).

Elevate concentrazioni plasmatiche di CRP sono state evidenziate in seguito a diverse condizioni: traumi, chirurgia, ustioni, pancreatite acuta, disordini autoimmuni e reumatici, tumori maligni ed infarto miocardico (Mitaka, 2005). È stata dimostrata la presenza di alti livelli plasmatici di CRP anche in corso di Sepsis (Povoa *et al.*, 1998).

Diversi studi hanno evidenziato come la proteina C reattiva non sia in grado di differenziare la Sepsis dalla SIRS non infettiva (Selberg *et al.*, 2000) e come i livelli di tale proteina non riflettano la gravità della Sepsis (Luzzani *et al.*, 2003). Il picco tardivo a 36-50 ore dall'inizio del processo infiammatorio può ridurne la sensibilità come biomarker. Le concentrazioni di CRP raggiungono un certo livello che non può generalmente essere superato e tali valori elevati possono essere riscontrati già negli stadi meno severi della Sepsis (Mitaka, 2005).

1.6.1.5 Neopterina

La neopterina è un derivato della pteridina prodotto dai macrofagi a partire dalla guanosina trifosfato (GTP), soprattutto quando stimolati da IFN- γ , TNF- α ed endotossine. I livelli plasmatici di neopterina aumentano in corso di Sepsis e, a differenza della PCT, tale aumento viene riportato anche in corso di infezioni virali (Fuchs *et al.*, 1988). In aggiunta, la neopterina si è poi rilevata essere un buon marker di alcune neoplasie maligne e specialmente di mieloma multiplo (Boccardo *et al.*, 1991). L'esatto ruolo di tale molecola non è ancora chiaro, ma è stato dimostrato che è capace di stimolare la sintesi di ossido nitrico e rientra tra i fattori in grado di indurre l'apoptosi cellulare (Hotchkiss *et al.*, 1999).

1.6.1.6 Marker endoteliali

Fra gli eventi che si realizzano in corso di SIRS, un momento fondamentale è rappresentato dall'attivazione dell'endotelio. Quest'ultimo presenta un'aumentata espressione di molecole di adesione di superficie quali P-selectina, E-selectina e molecole di adesione intercellulare (ICAM-1). Una piccola quantità di queste viene liberata in circolo ed è accessibile per un'analisi plasmatica. Tra i fattori espressione di danno endoteliale è stato valutato come potenziale marker la forma solubile della trombomodulina, il cui tasso circolante risulta aumentato in corso di Sepsis, anche se tale incremento plasmatico può essere rilevato in diversi processi patologici (Redl *et al.*, 1995).

1.6.1.7 Componente C3a del complemento

La componente C3a è un mediatore pro-infiammatorio del sistema del complemento la cui attivazione determina: aumento di permeabilità vascolare, attrazione ed immobilizzazione di leucociti nel sito di flogosi ed aumento delle loro capacità fagocitarie. Gli studi presenti indicano un aumento dei livelli plasmatici in corso di infiammazione sistemica e mostrano che tali valori sono molto più alti in pazienti settici rispetto a pazienti con SIRS di origine non infettiva. Il saggio tramite cromatografia su colonna risulta difficoltoso e costoso (Selberg *et al.*, 2000).

1.6.2 CINETICA DEI MARKER PLASMATICI

La valutazione della cinetica plasmatica dei vari *biomarker* di Sepsis è importante per comprendere l'utilità di una loro misurazione oggettiva in corso di questa sindrome.

Le citochine sono le prime a mostrare un incremento dei loro livelli plasmatici, in particolare TNF- α raggiunge il picco dopo 90 minuti e IL-6 dopo 3 ore, ma presentano una breve emivita: tornano a livelli basali dopo solo 6 e 8 ore rispettivamente, consentendo solo una piccola finestra temporale per la loro rilevazione. CRP si innalza in 12-24 ore, mantiene il plateau di concentrazione per 20-72 ore e rimane elevata per 3-7 giorni (Redl *et al.*, 2003).

La procalcitonina si trova in condizioni intermedie rispetto a citochine e CRP. I livelli plasmatici di PCT cominciano ad aumentare circa 4 ore dopo la somministrazione di LPS, raggiungono il picco a 6 ore e si mantengono a livelli stabili per 8-24 ore (Dandona *et al.*, 1994). Queste caratteristiche ne fanno un marker di risposta rapida, per rilevare precocemente lo stato di Sepsis, la cui emivita plasmatica si presta ad un campionamento seriale in grado di fornire informazioni accurate sull'andamento del processo morboso (Redl *et al.*, 2003).

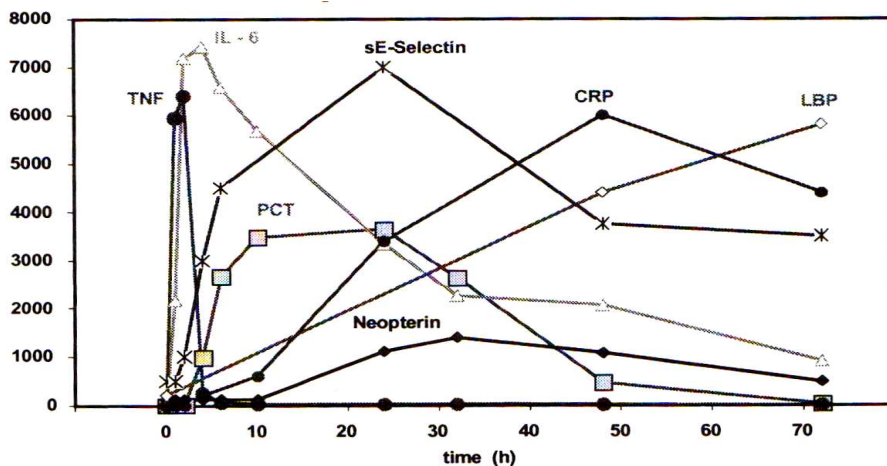


Fig. 1.7 Cinetica dei marker plasmatici dopo iniezione di *E.coli* in un primate non umano. Fattori di correzione: PCT, TNF, IL-6 (pg/ml); Neopterin x10 (nmol/L); LBP, CRP x20 (mg/L); E-selectina x500 (pg/ml) (Redl *et al.*, 2003).

1.6.3 MARKER ASSOCIATI A CELLULE

Diverse molecole di superficie di vari tipi cellulari sono state studiate, per le quali sono stati messi a punto diversi metodi di analisi. Fra queste, in particolare:

1.6.3.1 MHC-II

Il complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*) di classe seconda (MCH-II) rappresenta una serie di geni che codificano per gli antigeni di superficie presenti nelle cellule presentanti l'antigene, quali monociti/macrofagi e linfociti T e B. Alcuni studi in medicina umana hanno investigato tale complesso, che nell'uomo è chiamato Human Leukocyte Antigens-DR (HLA-DR). L'espressione del HLA-DR nei monociti risulta diminuita in corso di Sepsis ed il grado di tale diminuzione è correlato alla gravità della condizione del paziente. Tuttavia questi risultati sono stati riscontrati in un sottogruppo di pazienti settici e la metodica risulta difficoltosa e poco ripetibile (Reinhart *et al.*, 2006).

1.6.3.2 CD-14

Si tratta di un recettore presente sulla superficie dei monociti/macrofagi capace di legare l'LPS e la LBP. Vari studi evidenziano la diminuita espressione di CD-14 sulla membrana dei monociti ed un incremento dei valori plasmatici della porzione solubile di questo recettore in corso di Sepsis. Tali riscontri sono inoltre correlati ad una prognosi sfavorevole (Aalto *et al.*, 2007).

2. LE CITOCHINE

Lo sviluppo di una risposta immunitaria efficace coinvolge cellule linfoidi, cellule infiammatorie e cellule ematopoietiche.

Le complesse interazioni tra queste cellule sono mediate da un gruppo di proteine collettivamente designato con il termine **citochine** per indicare il loro ruolo nella comunicazione cellula-cellula (Hoffman *et al.*, 2002).

Le citochine sono proteine a basso peso molecolare di origine proteica o glicoproteica con azioni regolatrici o infiammatorie secrete da globuli bianchi e cellule di varia altra natura presenti del corpo in risposta ad una serie di stimoli (Hoffman *et al.*, 2002).

Queste proteine svolgono un ruolo nel regolare lo sviluppo di cellule effettrici del sistema immunitario e, in alcune situazioni, possiedono di per sè delle funzioni effettrici.

Questo capitolo si concentra sull'attività biologica delle citochine, sulla loro struttura e sui loro recettori, sul segnale di trasduzione innescato dalle citochine in seguito al legame recettoriale, sul ruolo di queste nella patogenesi di alcune malattie e sull'uso terapeutico delle citochine o dei loro recettori.

2.1 PROPRIETÀ DELLE CITOCHINE

Le citochine si legano a recettori specifici sulla membrana di cellule bersaglio, provocando la trasduzione del segnale che in ultima analisi, è in grado di modificare l'espressione genica nelle cellule bersaglio stesse (Nicola, 1994).

La sensibilità della cellula di destinazione ad una particolare citochina è determinata dalla presenza di specifici recettori di membrana.

In generale, le citochine e i loro recettori mostrano un'elevata affinità l'uno per l'altro, con costanti di dissociazione che vanno da 10^{-10} a 10^{-12} M (Nicola, 1994).

Poiché la loro affinità è così elevata, le citochine sono in grado di mediare effetti biologici a concentrazioni picomolari.

Un singola citochina può legarsi ai recettori presenti sulla membrana della stessa cellula che l'ha secreta, esercitando un effetto definito **autocrino**.

La citochina può legarsi a recettori sulle cellule bersaglio nelle vicinanze della cellula secernente, esercitando azione **paracrina**; in pochi casi tali proteine sono in grado di legarsi a cellule bersaglio localizzate a distanza nel corpo, esercitando un'azione **endocrina** (Ozaki et Leonard, 2002).

Le citochine regolano l'intensità e la durata della risposta immunitaria stimolando o inibendo l'attivazione, la proliferazione e la differenziazione delle varie cellule e regolando la secrezione di anticorpi o di altre citochine.

Come descritto più avanti, il legame di precise tipologie di citochine a cellule bersaglio, generalmente, stimola un'aumentata espressione di recettori per altre citochine e la secrezione di altre citochine, che colpiscono altre cellule target a loro volta. In tal modo le citochine secrete anche da un piccolo numero di linfociti attivati da antigeni possono influenzare l'attività di numerose cellule coinvolte nella risposta del sistema immunitario. Ad esempio, le citochine prodotte da un linfocita T helper attivato sono in grado di influenzare l'attività dei linfociti B, dei linfociti T citotossici, dei linfociti T natural killer, dei macrofagi, dei granulociti, e delle cellule staminali del comparto ematopoietico, attivando così un'intera rete di interazione fra cellule.

Alle citochine vengono attribuite le caratteristiche di pleiotropia, ridondanza, sinergia, antagonismo e la cascata di induzione, che consentono loro di regolare l'attività cellulare in una maniera coordinata e interattiva.

Nel momento in cui una data citochina svolge differenti effetti biologici su diverse cellule bersaglio, tale capacità viene definita *pleiotropismo* (**fig 2.1**) (Ozaki *et* Leonard, 2002).

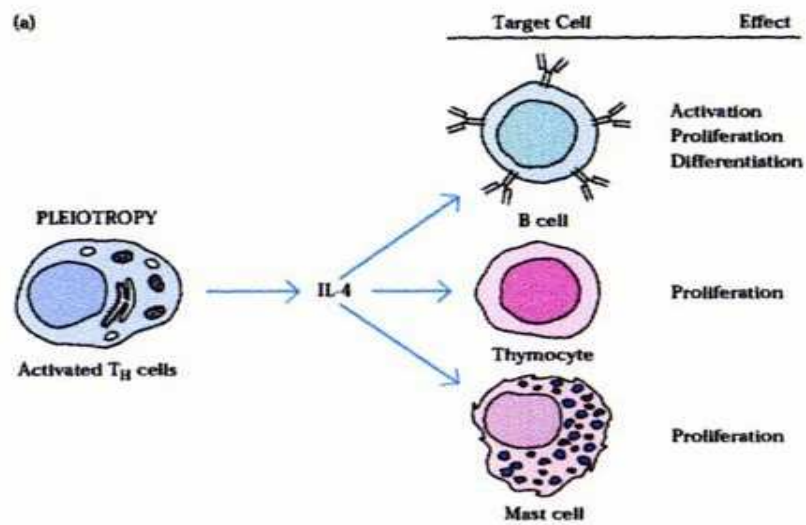


Figura 2.1 Schematizzazione dell'effetto di pleiotropia esercitato da IL 4.

Due o più citochine si definiscono *ridondanti* (**fig 2.2A**) quando mediano funzioni simili; per tale ragione è alquanto difficile attribuire una particolare attività *in vivo* alla singola citochina (Leonard, 1999).

La *sinergia* (**fig 2.2B**) fra citochine si verifica quando l'effetto combinato di due citochine sulle attività cellulari assume effetto l'additivo rispetto all'effetto esercitato dalla singola citochina (Leonard, 1999).

In altri casi, le citochine mostrano *antagonismo* (**fig 2.2C**) per il quale, gli effetti di una citochina inibiscono o compensano gli effetti di altre citochine (Leonard, 1999).

La *cascata di induzione* è invece quel fenomeno che si verifica quando l'azione di una citochina su una cellula di destinazione induce quest'ultima alla produzione di una o più citochine, che a loro volta possono indurre altre cellule bersaglio alla produzione di altre citochine e così via (Leonard, 1999).

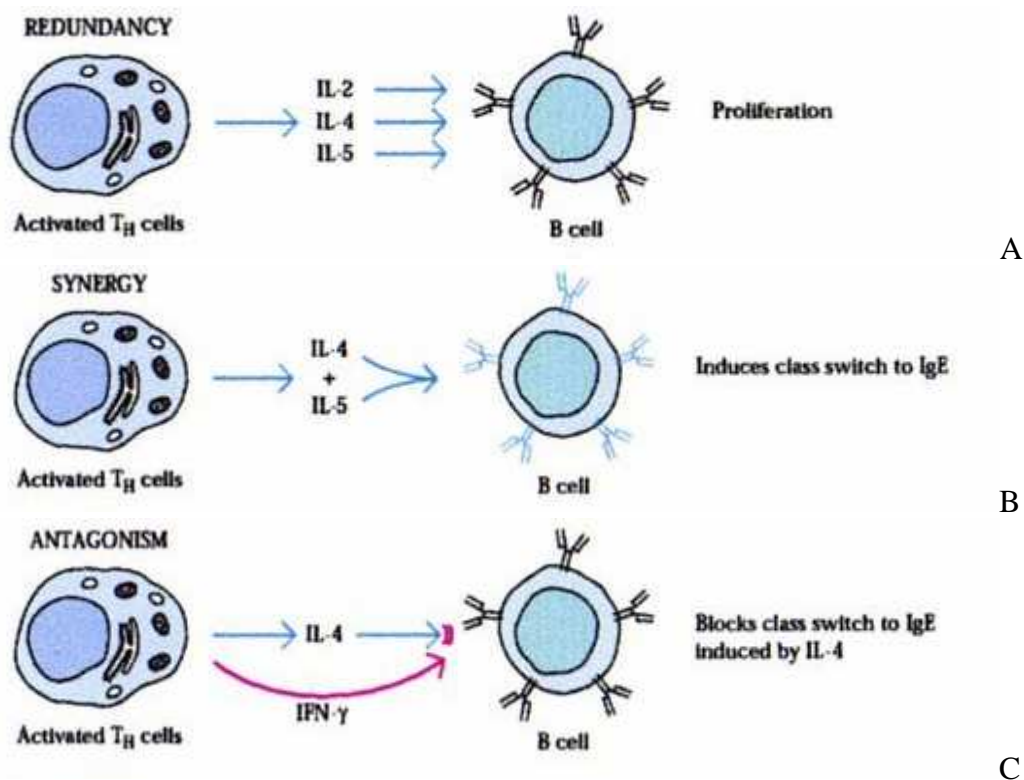


Figura 2.2 Schematizzazione delle caratteristiche delle citochine:

- ◆ **2.2A: ridondanza** esercitata dall'azione di IL 4, IL 5 e IL 2.
- ◆ **2.2B: sinergia** fra IL 4 e IL 5 in grado di indurre uno switch nella produzione anticorpale di IgE
- ◆ **2.2C: antagonismo** fra IL 4 ed IFN γ sulle cellule B per quanto concerne il blocco dello switch nella produzione anticorpale di IgE

Il termine di citochine comprende proteine secrete da linfociti, sostanze precedentemente note come linfocine, e proteine secrete da monociti e macrofagi, sostanze precedentemente note come monochine.

Sebbene questi altri due termini continuino ad essere utilizzati, sono forvianti dato che la secrezione di molte linfocine e monochine non è limitata a linfociti e monociti come questi termini farebbero pensare, ma si estende ad un ampio spettro di cellule. Per questo motivo, il termine più inclusivo di citochine è da preferirsi.

Molte citochine sono indicate come interleuchine, un termine che indica che esse sono secrete da alcuni leucociti e sono capaci di agire su altri leucociti.

Nuove citochine vengono continuamente identificate e anche le funzioni nelle quali queste proteine sono coinvolte non fanno che evolversi continuamente. A fianco di gruppi di citochine dalle funzioni ben note quali interferoni e fattori di necrosi tumorale, recentemente stanno guadagnando importanza anche altri sottogruppi di citochine, le chemochine, un gruppo di citochine a basso peso molecolare che influenzano chemiotassi e altri aspetti del comportamento leucocitario.

Poiché le citochine condividono molte proprietà con ormoni e fattori di crescita, la distinzione tra queste tre classi di mediatori è spesso poco chiara.

Tutti e tre infatti, sono secreti come fattori solubili che innescano i loro effetti biologici a concentrazioni picomolari legandosi ai recettori sulle cellule bersaglio (Leonard, 1999).

I fattori di crescita però tendono ad essere prodotti in maniera discreta, mentre le citochine e gli ormoni sono secreti in risposta ad uno stimolo che innesci una secrezione di breve durata, in genere da un poche ore a pochi giorni. A differenza degli ormoni, che in generale agiscono a lunga distanza in maniera endocrina, la maggior parte delle citochine svolge la sua funzione a breve distanza in maniera autocrina o paracrina.

La maggior parte degli ormoni inoltre, sono prodotti da ghiandole specializzate e tendono ad avere un'unica attività su una o poche tipologie di cellule target. Al contrario, le citochine sono spesso prodotte da una varietà di cellule di diversa natura e settori anatomici e vanno a legarsi a siti recettoriali presenti su molteplici cellule target (Leonard, 1999).

L'attività delle citochine è stata scoperta nella prima metà degli anni '60, quando all'interno di surnatanti derivati da colture *in vitro* di linfociti sono stati trovati fattori capaci di regolare e innescare proliferazione, differenziazione e maturazione di cellule allogeniche del sistema immunitario.

Poco dopo, si è scoperto che la produzione di questi fattori ad opera di colture linfocitarie poteva essere indotta dall'attivazione mediante antigeni o con mitogeni non specifici. L'isolamento biochimico e la purificazione delle citochine era ostacolata a causa della loro bassa concentrazione nel surnatante della coltura cellulare e per la mancanza di ben definiti sistemi di valutazione per le singole citochine. Un grande progresso è stato fatto con lo sviluppo di tecniche di clonazione genica nel corso degli anni 1970-80, che ha reso possibile la produzione di citochine facendole esprimere dai geni clonati (Leonard, 1999).

La scoperta di linee cellulari la cui crescita dipende dalla presenza di un particolare tipo di citochina ha fornito ai ricercatori il primo semplice test per la valutazione dell'azione esercitata dalla singola citochina.

La derivazione di anticorpi monoclonali specifici per ciascuna delle più importanti citochine ha reso possibile un rapido sviluppo di tecniche immunologiche quantitative per ciascuna di esse.

2.2 LE FAMIGLIE STRUTTURALI

Una volta che il gene codificante per varie citochine venne clonato, sufficienti quantitativi di proteine purificate si sono rese disponibili per studi più approfonditi sulla loro struttura e funzione.

Le citochine hanno generalmente una massa molecolare inferiore ai 30 kDa; studi strutturali hanno dimostrato che le citochine caratterizzate finora appartengono a quattro gruppi: la famiglia delle ematopoietine, la famiglia degli interferoni, la famiglia delle chemochine e, infine, la famiglia dei fattori di necrosi tumorale (Ozaki *et* Leonard, 2002).

Sebbene a volte la sequenza aminoacidica differisca considerevolmente, i membri appartenenti alla stessa famiglia presentano un elevato grado di omologia strutturale. Un esempio è costituito da 2 membri appartenenti alla famiglia delle ematopoietine, IL 2 e IL 4, che nonostante differiscano in maniera significativa per quanto concerne la sequenza aminoacidica, entrambe presentano un elevato grado di strutture ad α eliche e scarse od assenti strutture a β pieghe. Tali molecole condividono un polipeptide simile in 4 regioni ad α elica nelle quali prima e seconda elica si sviluppano parallelamente; stessa struttura dicasi per la terza e la quarta. Tutte tali α eliche sono connesse attraverso un uncino (Ozaki et Leonard, 2002).

2.3 FUNZIONI BIOLOGICHE

Una gran varietà di cellule è in grado di secernere citochine, ma le due principali fonti di tali mediatori sono i linfociti T helper (Th) e i macrofagi. Le citochine rilasciate da questi due tipi di cellule sono in grado di attivare una fitta rete d'interazioni fra cellule. Tra le numerose risposte fisiologiche che richiedono il coinvolgimento delle citochine vi sono lo sviluppo di risposte immunitarie cellule mediate e umorali, l'induzione della risposta infiammatoria, la regolazione dell'ematopoiesi di regolamento, il controllo della proliferazione e della differenziazione cellulare e la guarigione di ferite (Hoffman *et al.*, 2002).

Sebbene la risposta immunitaria ad un antigene specifico possa includere la produzione di citochine, è importante ricordare che le citochine agiscono in maniera antigene-non-specifico. Esse infatti esercitano effetto su qualsiasi tipologia presenti dei recettori affini ad esse e che siano in uno stato fisiologico che permette loro di rispondere (Hoffman *et al.*, 2002).

Le citochine sono coinvolte in una vasta gamma di attività biologiche tra cui l'immunità innata ed adattativa, l'infiammazione e l'ematopoiesi.

Complessivamente, il numero totale di proteine asseribili ad attività citochinica supera ormai 100 e la ricerca continua a scoprirne di nuove. Ad ogni gruppo viene attribuita una serie di funzioni individuate, per lo più, da analisi di citochine ricombinanti, spesso addizionate alle colture cellulari a concentrazioni non fisiologiche in corso di indagini effettuate *in vitro* (Hoffman *et al.*, 2002).

In vivo, in realtà, le citochine raramente agiscono da sole. Al contrario, una cellula di destinazione è esposta ad un ambiente contenente una miscela di citochine, i cui effetti sinergici o antagonisti combinati possono avere conseguenze molto diverse. In aggiunta, le citochine spesso inducono la sintesi di altre citochine, con la risultante di una cascata di attivazione.

La non specificità delle citochine sembra apparentemente in conflitto con la specificità del sistema immunitario. In realtà la specificità della risposta immunitaria mediata da citochine viene mantenuta da un'attenta regolazione dell'espressione di recettori sulle superfici cellulari (Leonard, 1999).

Spesso i recettori di citochine sono espressi su una cellula solo dopo che questa ha interagito con l'antigene. In tal modo l'azione della citochina viene limitata ai linfociti antigene-attivati.

Altro requisito per mantenere una specificità di risposta è l'interazione fra cellula produttrice e cellula bersaglio della citochina stessa, in modo da garantire che concentrazioni efficaci di citochine vengano rilasciate solo in prossimità delle cellule target (Hoffman *et al.*, 2002).

Nel caso dei linfociti T helper, i maggiori produttori di citochine, una stretta interazione si verifica quando il recettore dei linfociti T (TCR) si lega al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) associato all'antigene sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC) quale un macrofago, una cellula dendritica o un linfocita B. Le citochine secrete in seguito a tale interazioni raggiungono concentrazioni di portata tale da agire sulle APC in sede locale ma tali da non esprimere la propria funzione più lontano. Inoltre, l'emivita di citochine nel sangue o di altri fluidi extracellulari in cui sono secreti è di solito molto bassa. Tutto ciò a confermare lo scarso se non assente effetto endocrino da parte delle citochine (Leonard, 1999).

In base alle principali azioni biologiche svolte, le citochine possono essere suddivise in tre gruppi:

I. Citochine che mediano e regolano l'immunità innata, prodotte soprattutto dai fagociti mononucleati in risposta agli agenti infettivi, in grado di alimentare reazioni infiammatorie precoci ai microrganismi (Hoffman *et al.*, 2002);

II. Citochine che mediano e regolano l'immunità acquisita, principalmente prodotte dai linfociti T in risposta al riconoscimento di antigeni estranei, che svolgono il compito di regolare la crescita e differenziazione di varie popolazioni linfocitarie e di reclutare cellule effettrici specializzate (Hoffman *et al.*, 2002);

III. Citochine che stimolano l'emopoiesi, prodotte da cellule stromali del midollo osseo, leucociti ed altri tipi cellulari, in grado di stimolare la crescita e la differenziazione dei leucociti immaturi (Broxmeyer *et al.*, 2008).

2.4 RECETTORI CITOCHINICI

Come già descritto, per esercitare le loro funzioni biologiche le citochine devono innanzitutto legarsi ad un recettore specifico espresso sulla membrana di cellule target.

Poiché tali recettori sono espressi da una moltitudine di cellule diverse, le citochine possono agire su diverse tipologie di cellule.

La caratterizzazione biochimica dei recettori per citochine inizialmente è stata molto difficoltosa visto la scarsa presenza di tali siti sulla membrana. Attraverso l'avvento di tecniche di biologia molecolare in grado di clonare i geni codificanti per tali recettori è stato possibile l'identificazione e la caratterizzazione di questi con maggior rapidità.

I recettori per citochine vengono divisi in 5 famiglie di appartenenza nonostante vi sia una notevole differenza da un punto di vista strutturale (Prieschl *et al.*, 1996; Barrett *et al.*, 1995).

Tale suddivisione comprende:

- la superfamiglia dei recettori per immunoglobuline (**fig 2.3(a)**);
- la famiglia di recettori citochinici di classe I, anche noti come famiglia dei recettori per l'ematopoietina (**fig 2.3(b)**);
- la famiglia di recettori citochinici di classe II, anche noti come famiglia dei recettori per l'interferone (**fig 2.3(c)**);
- la famiglia di recettori per i fattori di necrosi tissutale (TNF) (**fig 2.3(d)**);
- la famiglia di recettori per le chemochine (**fig 2.3(e)**).

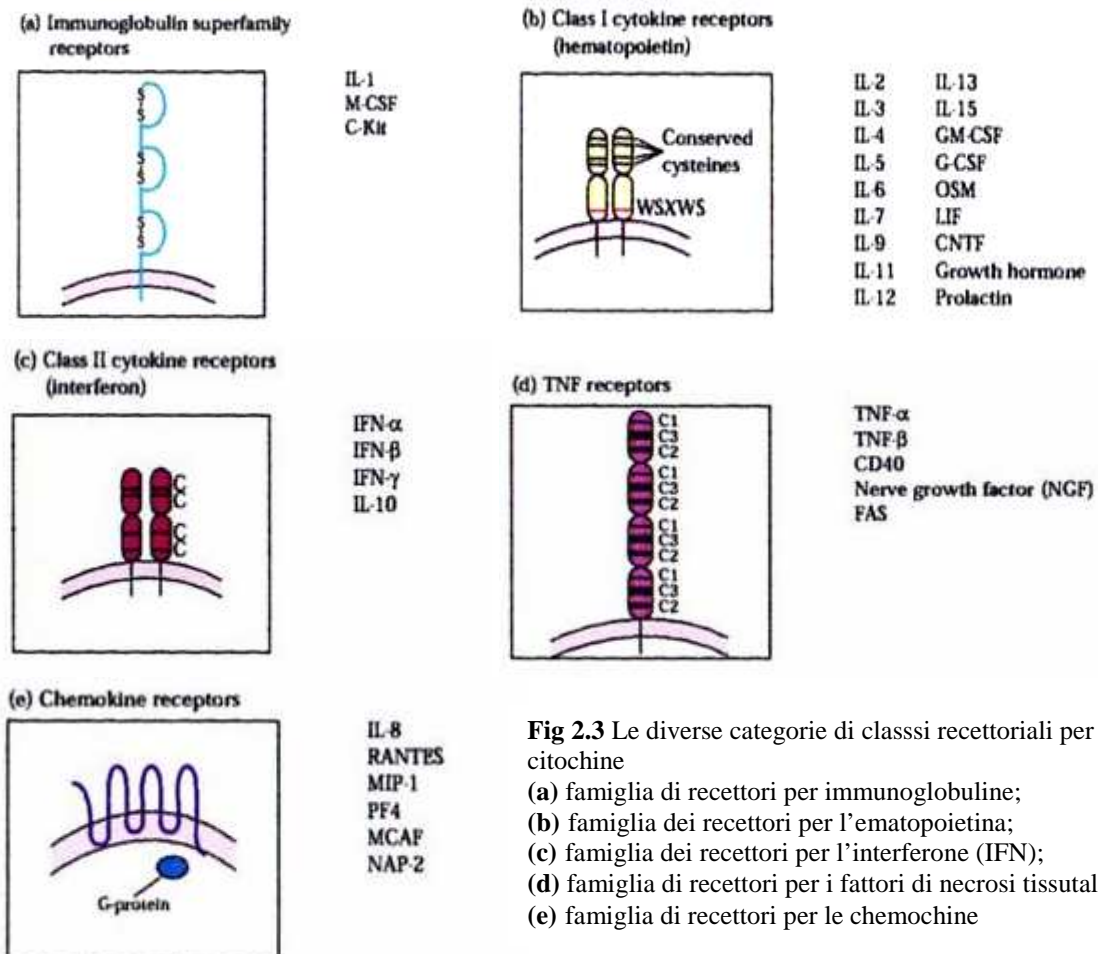


Fig 2.3 Le diverse categorie di classi recettoriali per le citochine
 (a) famiglia di recettori per immunoglobuline;
 (b) famiglia dei recettori per l'ematopoietina;
 (c) famiglia dei recettori per l'interferone (IFN);
 (d) famiglia di recettori per i fattori di necrosi tissutale (TNF);
 (e) famiglia di recettori per le chemochine

Molti dei recettori leganti citochine coinvolti nel funzionamento del sistema emopoietico e immunitario appartengono alla famiglia di recettori citochinici di classe I. I membri di tale famiglia hanno motivi di sequenze aminoacidiche conservate nel dominio extracellulare costituiti da 4 residui cisteinici (CCCC) e una conservata sequenza di triptofano-serina-aminoacido X-triptofano-serina (WSXWS, dove X sta ad indicare un qualsiasi aminoacido).

I recettori per tutte le citochine classificate come ematopoietine appartengono alla classe I, detta anche famiglia dei recettori per l'ematopoietina appunto (Onishi *et al.*, 1998).

La classe II di recettori per citochine possiede anch'essa un conservato motivo di sequenze aminoacidiche nel dominio extracellulare costituito da 4 residui cisteinici (CCCC) ma manca del motivo WSXWS. Inizialmente si pensava che solo i 3 interferoni α , β e γ fossero in grado di legarsi a tale tipo di recettori mentre recenti lavori hanno dimostrato come anche il recettore per l'IL 10 faccia parte della famiglia di classe II (Onishi *et al.*, 1998).

Da precisare come l'azione del recettore non preveda in maniera così dicotomica l'azione delle varie sub unità che lo compongono singolarmente nel legarsi alla citochina e nell'attivare la fosforilazione con trasduzione del segnale.

Il legame innescato su tutti i recettori appartenenti alle classi recettoriali I e II studiati fino ad oggi hanno mostrato indurre la fosforilazione della tirosina del recettore attraverso l'attività della proteina tirosina chinasi strettamente associata al dominio citosolico del recettore.

Sono state identificate molte sottofamiglie dei recettori di classe I, prendendo come criterio di classificazione una identica sub unità di trasduzione del segnale.

Proprio la condivisione di subunità per il segnale di trasduzione tra recettori spiega la ridondanza e l'antagonismo mostrato da alcune citochine.

Si consideri ad esempio la sottofamiglia dei recettori del GM-CSF, che comprende i recettori per IL-3, IL-5, e GM-CSF (Kishimoto *et al.*, 1992). Ognuna di queste citochine si lega ad un unico recettore a bassa affinità, citochina-specifico che consiste nella sola subunità α . Tutte e tre le subunità con bassa affinità sono in grado di associarsi in modo non covalente ad una subunità β con un segnale di trasduzione comune.

Il risultante recettore dimerico non solo mostra una maggior affinità per le citochine, ma è anche in grado di trasdurre un segnale lungo tutta la membrana dopo aver legato la citochina. Curiosamente, IL-3, IL-5 e GM-CSF mostrano una notevole ridondanza. IL-3 e GM-CSF agiscono sulle cellule ematopoietiche totipotenti e sulle cellule progenitrici, attivano monociti e inducono la differenziazione dei megacariociti (Mroczko *et Szmitkowski*, 2004). Tutte e tre queste citochine inducono la proliferazione degli eosinofili e la degranulazione dei basofili, con il rilascio di istamina.

Dal momento che i recettori per IL-3, IL-5, GM-CSF condividono un comune segnale di trasduzione mediante β subunità, ci si dovrebbe aspettare un simile segnale di attivazione da parte di ciascuna di queste citochine, dimostrando la ridondanza tra loro nell'indurre i diversi effetti biologici (Kishimoto *et al.*, 1992).

Infatti, tutte e tre le citochine inducono lo stesso pattern di fosforilazione proteica. Inoltre, IL-3 e GM-CSF mostrano antagonismo poichè IL-3 è stato dimostrato inibire il GM-CSF e viceversa (Mroczko *et Szmitkowski*, 2004).

Poiché il segnale di trasduzione della β subunità è condivisa tra i recettori per queste due citochine, il loro antagonismo è dovuto alla competizione per un numero limitato di subunità da parte della subunità citochine specifiche recettoriali. Una situazione simile si viene a creare all'interno della sottofamiglia del recettore per IL-6, che comprende i recettori per IL-6, IL-11, Fattore inibitorio della leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), e fattore neurotrofico ciliare (CNTF). In questo caso, un comune segnale-trasduzione chiamato subunità gp130 è associato a una o più subunità citochino-specifiche (Hibi *et al.*, 1996).

LIF e OSM, che devono condividere alcune caratteristiche strutturali, si legano alla stessa α subunità. Come ci si potrebbe aspettare, le citochine che si legano ai recettori in questa sottofamiglia esercitano degli effetti biologici sovrapponibili. IL-6, OSM, e LIF inducono infatti la sintesi di proteine di fase acuta in sede epatica e la differenziazione di cellule mieloidi leucemiche verso i macrofagi; IL-6, LIF, e CNTF vanno ad influenzare lo sviluppo neuronale mentre IL-6, IL-11, e OSM stimolano la maturazione dei megacariociti e la produzione di piastrine. La presenza di gp130 in tutti i recettori della sottofamiglia per IL-6 spiega la loro comune modalità di attivazione e, d'altra parte, la competizione per la limitata disponibilità di molecole gp130 osservata tra queste citochine.

Un terzo segnale di trasduzione caratterizza la sottofamiglia recettoriale IL-2, che comprende i recettori per l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. I recettori per IL-2 e IL-15 sono eterotrimeri, costituiti da una catena α citochina specifica e due catene β e γ responsabili del segnale di trasduzione.

La catena γ è responsabile del segnale di trasduzione negli altri recettori della sottofamiglia recettoriale dell'IL 2, che sono tutti i dimeri. Recentemente, è stato dimostrato una immunodeficienza congenita combinata grave cromosoma X dipendente (XSCID) risultante da un difetto del gene della catena γ , che è locato sul cromosoma X. Le immunodeficienze osservate in questo disturbo sono dovute alla perdita di tutte le funzioni citochino mediate dalla sottofamiglia recettoriale dell'IL-2.

2.5 SEGNALI DI ATTIVAZIONE RECETTORIALE

Anche se alcuni importanti recettori per le citochine si trovano al di fuori delle famiglie di classe I e II, la maggior parte sono inclusi all'interno di queste due famiglie.

La classe I e II di recettori per le citochine non sembravano presentare motivi di segnalazione (ad esempio, il motivo intrinseco della tirosina chinasi) .

Eppure, una delle prime osservazioni dimostrarono che in seguito all'interazione fra citochina e recettore, si otteneva una serie di fosforilazioni proteiche della tirosina (Onishi *et al.*, 1998).

Mentre in un primo momento questi risultati erano sconcertanti, in seguito sono stati spiegati da un modello unificante emerso dagli studi molecolari di eventi innescati dal legame fra interferone gamma (IFN- γ) e il suo recettore, un membro della famiglia di classe II. IFN- γ è stato originariamente scoperto a causa della sua capacità nell'indurre le cellule a bloccare o inibire la replicazione di una vasta gamma di virus. L'attività antivirale è una proprietà che condivide con IFN α e IFN- β .

Tuttavia, a differenza di questi altri interferoni, IFN- γ svolge un ruolo centrale in molti processi immunoregolatori, tra cui la regolazione dei fagociti mononucleati, lo *shift* di produzione da parte di linfociti B nella produzione di alcune classi di IgG e l'innescamento o l'inibizione dello sviluppo delle sottopopolazioni di linfociti T helper (Taniguchi, 1995).

La scoperta del principale modo di segnalazione determinata dall'interazione fra IFN- γ ed il suo recettore ha permesso la comprensione del segnale di trasduzione utilizzato dalla maggior parte, se non da tutti, i recettori per le citochine di classe I e II.

I recettori per citochine prevedono le seguenti fasi, che stanno alla base di un modello unificante di segnalazione. Il recettore di citochine è composto da subunità separate; una catena α necessaria per il legame con la citochina e la trasduzione del segnale ed una catena β necessaria per la segnalazione, ma con un ruolo minore anche nel legame con la citochina stessa.

Diverse proteine tirosina-chinasi inattive sono associate a diverse subunità recettoriali. La catena α recettoriale è associata alla famiglia di proteine tirosina-chinasi, la famiglia Janus chinasi (JAK).

L'associazione fra JAK e subunità recettoriale si verifica spontaneamente e non richiede il legame con le citochine. Tuttavia, in assenza di citochine, le JAKs perdono l'attività tirosina chinasi.

Il legame con la citochina induce l'associazione delle due subunità recettoriali e l'attivazione del recettore JAKs-associato (Taniguchi, 1995)..

JAKs attivate sono in grado di creare siti per il legame dei fattori STAT di trascrizione (segnali di trasduttori e di attivatori della trascrizione) attraverso fosforilazione di specifici residui di tirosina presenti sulle subunità recettoriali. Una volta che le JAKs recettore associate sono attivate, queste vanno a fosforilare tirosine specifiche nelle sub unità recettoriali del complesso. I membri della famiglia di fattori di trascrizione noti come STATs (segnali di trasduttori e di attivatori della trascrizione) si legano a questi residui tirosina fosforilati. Gli STATs specifici in tal modo vanno a giocare un ruolo essenziale nelle vie di trasduzione di una vasta gamma di citochine (Ross *et al.*, 2007).

Il legame degli STATs alle subunità del recettore è mediata dalla giunzione del dominio SH2 sugli STAT con sito legante creato dalla fosforilazione JAK-mediata della tirosina su una particolare subunità recettoriale.

Dopo essere stati sottoposti a fosforilazione JAK-mediata, i fattori di trascrizione STAT translocano dal sito di interazione recettoriale posto a livello di membrana verso il nucleo, dove determinano la trascrizione di geni specifici.

Mentre sono agganciati alla subunità del recettore, gli STATs sono sottoposti a fosforilazione JAK-catalizzata della tirosina. Questo è seguito dalla dissociazione delle STATs dalla subunità del recettore e loro dimerizzazione.

Gli STAT a questo punto in forma dimerica traslocano nel nucleo e inducono l'espressione di geni, contenenti appropriate sequenze di regolazione nelle loro regioni *promoters* (Ross *et al.*, 2007).

In aggiunta a IFN- γ , un certo numero di altri ligandi appartenenti alle classi I e II determinano la dimerizzazione dei loro recettori. Un elemento importante di citochino specificità deriva dalla squisita specificità del legame tra citochine e i loro recettori. Un altro aspetto delle citochine è la specificità che ogni particolare citochina (o gruppo di citochine ridondante) ha nell'indurre la trascrizione di uno specifico sottoinsieme di geni in un determinato tipo di cellula; il gene risultante va poi a mediare i vari prodotti esplicando gli effetti tipici di questa citochina.

La specificità degli effetti delle citochine è quindi riconducibile essenzialmente a tre fattori.

In primo luogo, particolari recettori per citochine avviano particolari percorsi JAK-STAT.

In secondo luogo, l'attività di trascrizione attivata dalle STATs risulta specifico perché solo un particolare STAT omodimero o eterodimero riconosce alcuni motivi sequenza ed è quindi in grado di interagire solo con i promotori di alcuni geni.

In terzo luogo, solo quei geni target la cui espressione è consentita da particolari tipi di cellule possono essere attivato entro tale varietà di cellula. Per cui, in ogni tipo di cellula può essere consentita solo l'espressione di alcuni geni bersaglio mediante l'attivazione di una particolare STAT. Ad esempio, IL-4 induce un set di geni nei linfociti T, un altro nei linfociti B e ancora un terzo negli eosinofili (Ross *et al.*, 2007).

2.6 ANTAGONISTI DELLE CITOCHINE

Sono state segnalate un certo numero di proteine in grado di inibire l'attività biologica delle citochine. Queste proteine agiscono in uno dei seguenti due modi: o si legano direttamente ad un recettore per le citochine, senza attivare la cellula, o si legano direttamente a una citochina, inibendo la sua attività (Van der Pool et Van Deventer, 1999).

L'antagonista più caratterizzato è rappresentato dall'antagonista del recettore per IL 1 (IL-1Ra), che si lega al recettore per IL-1, ma non ha alcuna attività.

Il legame fra IL-1Ra e recettore per IL-1 agisce bloccando l'attività su ambedue i fronti di IL-1 α e IL-1 β , quindi è importante per le sue proprietà antagoniste.

La produzione di IL-1Ra è stato pensato da alcuni giocare un ruolo nella regolazione dell'intensità della risposta infiammatoria.

Tale antagonista è stato clonato ed è attualmente in fase di studio come potenziale trattamento per le malattie infiammatorie croniche.

Gli inibitori delle citochine sono stati individuati nel sangue e nel fluido extracellulare. Questi antagonisti solubili provengono da scissione enzimatica del dominio extracellulare di recettori per citochine (Van der Pool et Van Deventer, 1999).

Tra i recettori solubili di citochine che sono stati rilevati vi sono quelli di IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, e IFN- α e IFN- γ , TNF β e LIF.

Di questi, l'antagonista solubile del recettore IL-2 (sIL-2R), che viene rilasciato nell'attivazione cronica dei linfociti T, è il meglio caratterizzato. Un segmento contenente la sequenza aminoterminale di 192 aminoacidi della subunità α è rilasciata da clivaggio proteolitico, formando un recettore IL-2 solubile del peso di 45 kDa. Il recettore liberato può legare l'IL-2 e, di fatto, prevenire la sua interazione con il recettore di membrana per IL-2. La presenza di sIL-2R è stata usata come marcatore clinico dell'attivazione cronica dei linfociti T osservate in numerose malattie tra cui risposte autoimmuni, rigetto di trapianto e AIDS (Burger et Dayer, 1995).

Alcuni virus inoltre producono proteine che legano le citochine o proteine in grado di imitare le citochine stesse. L'evoluzione di tali strategie anti-citochine da parte di agenti microbici patogeni è prova dell'importanza rivestita dalle citochine nell'organizzazione e nella promozione di efficaci risposte immunitarie antimicrobiche (Van der Pool et Van Deventer, 1999).

I poxvirus, ad esempio, hanno dimostrato la capacità di codificare fattori solubili in grado di legarsi al TNF e all'IL-1. Dato che sia TNF che IL-1 mostrano un ampio spettro di attività nella risposta infiammatoria, questi fattori solubili legandosi alle citochine dell'ospite possono vietare o diminuire gli effetti infiammatori, conferendo in tal modo al virus un vantaggio selettivo.

Il virus Epstein-Barr produce un'IL-10 (IL-10 virale o vIL-10) che si lega al recettore per IL-10 endogena e sopprime la risposta cellulo-mediata di tipo Th1, risposta efficace contro molti parassiti intracellulari quali i virus.

Le molecole prodotte dal virus, imitando le citochine dell'ospite, consentono al virus di manipolare la risposta immunitaria in modo da permettere la sopravvivenza dell'agente patogeno. Si tratta di un interessante e potente *escamotage* attuato da alcuni virus nella loro continua lotta per superare la formidabile barriera costituita dal sistema immunitario (Burger et Dayer, 1995).

2.7 Secrezione di citochine da parte di sottopopolazioni linfocitarie T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2)

La risposta immunitaria a un particolare agente patogeno deve indurre una appropriata serie di reazioni effettrici capaci di eliminare il microrganismo e i suoi prodotti tossici dall'organismo. Per esempio, la neutralizzazione di una tossina batterica richiede la presenza di anticorpi solubili, mentre la risposta ad un virus intracellulare o ad una cellula batterica richiede una risposta di citotossicità cellulo-mediata o una ipersensibilità di tipo ritardato.

Un notevole numero di studi avvalorano la distinzione in sottoinsiemi di linfociti T helper (Th) in conseguenza della capacità di secernere determinate citochine come determinanti nella risposta immunitaria ad una particolare antigene.

I linfociti Th CD4⁺ esercitano la maggior parte delle loro funzioni d'aiuto appunto mediante secrezione di citochine, che agiscono sia sui linfociti che li producono in maniera autocrina, sia modulando le risposte di altri linfociti attraverso azioni paracrine.

Sebbene anche i linfociti T citotossici CD8⁺ (CTLs) siano in grado di secernere citochine, la loro gamma di citochine è generalmente più ristretta rispetto a quella dei linfociti Th CD4⁺.

Possono essere pertanto distinte *in vitro* sulla base delle citochine che secernono. due sottopopolazioni di linfociti Th CD4⁺ designati con le definizioni Th1 e Th2.

Entrambi i sottoinsiemi possono secernere IL-3 e GM-CSF, ma differiscono nelle altre citochine che sono in grado di produrre. I linfociti Th1 e Th2 sono caratterizzati dalle seguenti differenze funzionali (Onoè *et al.*, 2007):

- Il sottoinsieme Th1 è responsabile di molte funzioni cellulo-mediate (ad esempio, l'ipersensibilità di tipo ritardato e l'attivazione di linfociti T citotossici (Tc), e per la produzione di anticorpi IgG (cioè anticorpi che si legano ad alta affinità con i recettori Fc dei fagociti e interagire con il sistema di complemento) con promozione della opsonizzazione. A questo sottoinsieme è anche associata la promozione di una eccessiva infiammazione fino ad una eventuale lesioni dei tessuti.
- Il sottoinsieme Th2 attiva e stimola la differenziazione degli eosinofili, fornisce aiuto ai linfociti di tipo B, e promuove una produzione di grandi quantità di IgM, IgE, e, non ultimo, IgG isotipiche. Il sottoinsieme Th2 è coinvolto anche nelle reazioni allergiche.

Le differenze nelle citochine secrete fra linfociti Th1 e Th2 determinano le diverse funzioni biologiche di queste due sottoinsiemi.

Una citochina che definisce il sottoinsieme dei linfociti Th1 è rappresentato dall'IFN- γ , che fra le sue funzioni cardine presenta quella di attivare i macrofagi, stimolando l'attività microbica di queste cellule, up-regolare il livello di MHC di classe II e secernere citochine quali IL-12, che inducono i linfociti a differenziarsi da T helper naive (Th0) verso il sottoinsieme Th1.

La secrezione di IFN- γ da parte di linfociti Th1 induce anche lo *shift* nella produzione di anticorpi di classe IgG verso la produzione di IgG2a, che supportano la fagocitosi e il fissaggio del complemento (Chaouat, 2007).

TNF β e IFN γ sono citochine coinvolte nell'infiammazione ed una loro secrezione rappresenta il nesso fra linfociti Th1 e fenomeni infiammatori quali l'ipersensibilità di tipo ritardato.

I linfociti Th1 producono IL-2 e IFN- γ , citochine che promuovono la differenziazione di linfociti citotossici (Tc) CD8⁺ dai rispettivi precursori. Questo pattern di produzione citochinica da parte dei Th1 rende particolarmente adatto tale sottoinsieme nella risposta alle infezioni virali e agli agenti patogeni intracellulari. Infine, IFN- γ inibisce l'espansione della sottopopolazione Th2 (Hayglass *et al.*, 1996).

La secrezione di IL-4 e IL-5 da parte dei linfociti del sottoinsieme Th2 induce la produzione di IgE e sostiene la risposta eosinofilo-mediata verso le infestazioni da elminti. IL-4 promuove uno *switching* del pattern di produzione anticorpale verso la classe IgG, impedendo l'attivazione del complemento (IgG1 nei topi, per esempio).

IL-4 aumenta anche la misura in cui i linfociti B modulano la produzione di immunoglobuline da una classe da IgM a quella delle IgE. Questo effetto sulla produzione di IgE predispose la differenziazione degli eosinofili e l'attivazione mediata dall'IL-5, perché gli eosinofili sono riccamente dotati di recettori per la frazione costante (FcC) determinando un legame con le IgE. In genere, le infestazioni da elminti inducono risposte Th2 mediate da anticorpi IgE. L'anticorpo legato all'elminta si lega alla frazione costante dei recettori della membrana degli eosinofili, formando così un ponte antigene-specifico tra elminta ed eosinofili. L'attacco degli eosinofili al verme necessita dell'attivazione di tale legame. Nonostante queste azioni utili, le IgE sono anche la classe di immunoglobuline responsabile di allergia. Infine, IL-4 e IL-10 sopprimono l'espansione dei linfociti Th1.

Poiché la distinzione fra sottoinsiemi Th1 e Th2 è stata inizialmente possibile solo dallo studio *in vitro* di alcune culture cellulari, alcuni ricercatori hanno dubitato che tale distinzione fosse altrettanto possibile *in vivo*. Essi hanno invece suggerito come questi sottoinsiemi possano rappresentare un'evoluzione in senso maturativo di linfociti derivanti da una unica popolazione, diverse fasi di un unico lignaggio.

Inoltre, l'iniziale fallimento nell'individuare nella specie umana le diverse sottopopolazioni Th1 o Th2 ha fatto ipotizzare caratteristiche di specie specificità in tale classificazione.

Ulteriori ricerche hanno corretto tali opinioni. In molti sistemi *in vivo*, il pieno coinvolgimento di sottopopolazioni di linfociti T helper (Th1 o Th2) spesso rappresentano marker specifici di flogosi cronica o allergia (Chaouat, 2007).

E' anche importante sottolineare come molti linfociti T helper non mostrino una polarizzazione della produzione citochinica verso una sottopopolazione Th1 o Th2.

Uno dei migliori descritti di questi è il sottoinsieme Th0, che secreta IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-10, così come IL-3 e GM-CSF (Hayglass *et al.*, 1996).

Numerose relazioni di studi in modelli murini e nell'uomo documentano come *in vivo* l'esito della risposta immunitaria può essere influenzata dai relativi livelli di espressione citochinica dei singoli fenotipi Th1 piuttosto che Th2.

Normalmente il profilo di citochine Th1 è maggiormente coinvolto in risposta ad agenti patogeni intracellulari, mentre la risposta di tipo Th2 è più elevata nelle malattie allergiche e nelle infestazioni da elminti.

Lo sviluppo di sottoinsiemi Th1 e Th2 è determinato dal rilascio di citochine nell'ambiente in cui tali componenti cellulari si vengono a trovare, rilascio innescato in base alla presenza di determinati antigeni.

La differenziazione determina il sottoinsieme che si sviluppa. In particolare, IL-4 è essenziale per lo sviluppo di una risposta Th2, mentre IFN- γ , IL-12 e IL-18 sono tutti importanti nella fisiologia dello sviluppo di linfociti Th1 (Chaouat, 2007).

La maggiore fonte di IL-12, uno dei principali mediatori di differenziazione Th1, è tipicamente costituita da macrofagi o cellule dendritiche attivate da un incontro con i batteri intracellulari, con prodotti di origine batterica quali LPS o con un certo numero di altri parassiti intracellulari. Lo sviluppo di linfociti del fenotipo Th1 dipende anche dalla presenza di IFN- γ , che induce numerosi cambiamenti tra cui la up-regolazione della produzione di IL-12 da parte di macrofagi e cellule dendritiche, e l'attivazione del recettore per IL-12 sulla membrana di linfociti T, che si compie da up-regolazione di espressione della catena del recettore IL-12. All'inizio della risposta immunitaria, IFN- γ è generato dalla stimolazione di T linfociti e può provenire anche da linfociti NK attivati.

Ancora l'IL-18, promuove la proliferazione e la produzione di IFN- γ da parte di linfociti NK e Th1 in via di sviluppo ma anche pienamente differenziati. Dunque, una complicata rete di citochine controlla positivamente la generazione di linfociti Th1.

Il ruolo critico svolto da ciascuna di queste citochine e dei loro recettori è stata dimostrata in una serie di esperimenti in cui sia citochine, sia i loro recettori sono stati eliminati (vedi sezione dedicata alle singole citochine).

2.8 ESEMPI DI PATOLOGIE COINVOLGENTI CITOCHINE

2.8.1 Lo shock settico di natura batterica

Lo shock settico di natura batterica è comune e potenzialmente mortale. Il ruolo della sovrapproduzione di citochine nella patogenesi di molte patologie può essere illustrato prendendo come esempio lo shock settico di origine batterica. Questa condizione può svilupparsi poche ore dopo l'infezione da parte di alcuni batteri gram-negativi, tra cui *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Neisseria meningitidis* (Cavaillon *et al.*, 2003).

I sintomi di shock settico batterico, che è spesso fatale, includono un calo della pressione sanguigna, febbre, diarrea, e diffusa coagulazione intravasale (CID) del sangue nei vari organi.

Lo shock settico batterico apparentemente si sviluppa a causa di endotossine presenti nella parete batterica che stimolano i macrofagi verso un'eccessiva produzione di IL-1 e di TNF- α a livelli che causano appunto lo shock (Cavaillon *et al.*, 2003).

In uno studio, per esempio, sono stati trovati livelli di TNF- α più elevati in pazienti che sono morti di meningite che in quelli che hanno superato la patologia. Inoltre, una condizione simile allo shock settico batterico può essere riprodotta in topi mediante iniezione di TNF- α ricombinante in assenza di infezione batterica sostenuta da gram-negativi.

Numerosi studi fanno ben sperare riguardo la neutralizzazione di TNF- α o di IL-1 con anticorpi monoclonali che vadano ad impedire o antagonizzare lo sviluppo di questo shock fatale in corso di tali infezioni batteriche (Reddy *et al.*, 2001).

In uno studio, un anticorpo monoclonale diretto verso il TNF- α ha protetto gli animali dallo shock endotossino-indotto. Un altro studio ha dimostrato che l'iniezione di IL-1 ricombinante antagonista- recettoriale (IL-1Ra), impedendo il legame fra IL-1 e il suo recettore, determinava riduzione della mortalità di tre volte. Si può sperare pertanto che questi risultati sperimentali porteranno a prodotti clinicamente disponibili per il trattamento di shock settico batterico negli esseri umani (Cavaillon *et al.*, 2003).

2.8.2 Shock tossico batterico causato da superantigeni

Una varietà di microrganismi producono attivamente (Gram +) o liberano tossine tramite lisi della loro parete (Gram -) che agiscono come superantigeni (SAg) (Cameron *et al.*, 2001).

Tali superantigeni impegnano contemporaneamente la molecola MHC di classe II e il dominio V β sul recettore dei linfociti T (TCR), attivando tutti i linfociti T muniti di quel particolare dominio V β (Cameron *et al.*, 2001).

A causa della loro capacità unica, i superantigeni sono in grado di attivare un gran numero di linfociti T, indipendentemente della loro specificità antigenica. Sebbene meno dello 0,01% di linfociti T possa rispondere ad un determinato antigene convenzionale, tra il 5% e il 25% di linfociti T possono rispondere a un determinato superantigene.

L'ampia percentuale di linfociti T capace di rispondere a un particolare superantigene è giustificato dal limitato numero di geni TCR V β presente nella linea germinale.

I topi, per esempio, possiedono circa 20 geni V β ; supponendo che ogni gene V β sia espresso con la stessa frequenza, ogni superantigene possa interagire con 1 linfocita T ogni 20, ovvero il 5% del totale della popolazione linfocitaria T (Krakauer, 1999; Cameron *et al.*, 2001).

Un certo numero di superantigeni batterici sono stati individuati quali agenti scatenanti di numerose malattie come shock tossici batterici e intossicazioni alimentari. Inclusi tra questi superantigeni batterici vi sono diverse enterotossine, le tossine esfolianti, la sindrome da shock tossico-tossina (TSST1) da *Staphylococcus aureus*; le esotossine pirogene da *Streptococcus pyrogenes* e il surnatante di *Mycoplasma Arthritidis* (MAS) (Krakauer, 1999).

Il gran numero di linfociti T attivati da questi superantigeni risultano in un'eccessiva produzione di citochine. La sindrome da tossina shock-tossica, per esempio, ha dimostrato di indurre livelli estremamente elevati di TNF e IL-1 come in corso di shock settico batterico. Queste elevate concentrazioni di citochine sono in grado di indurre reazioni sistemiche che includono febbre, coagulazione intravasale disseminata (CID) e shock.

2.8.3 Neoplasie di natura linfoide e mieloide

Anomalie nella produzione di citochine o dei loro recettori sono state associate ad alcuni tipi di cancro. Per esempio, anomalie nell'eccessivo livello di IL-6 sono secreti in cellule tumorali di mixoma cardiaco (un tumore benigno del cuore), in cellule di mieloma e plasmocitoma, e in cellule tumorali di cancro vescicale (Orlandi *et al.*, 2005).

In cellule neoplastiche di mieloma, IL-6 sembra operare in un modo autocrino per stimolare la proliferazione delle cellule. Quando anticorpi monoclonali di IL-6 sono aggiunti alle culture in vitro di linfociti derivanti da mieloma, la loro crescita è inibita. Inoltre, topi transgenici che esprimono alti livelli di IL-6 hanno mostrato esibire una massiccia e fatale proliferazione plasmacellulare, definita plasmacitosi. Anche se queste non sono plasmacellule maligne, l'elevato tasso di proliferazione plasmacellulare può eventualmente contribuire allo sviluppo del cancro (Orlandi *et al.*, 2005).

2.8.4 Malattia di Chagas

La malattia di Chagas è causata da un parassita, il protozoo *Trypanosoma cruzi*, che determina una soppressione immunitaria grave (Tarleton, 1991).

La capacità di *T. cruzi* nel determinare la soppressione immunitaria è stata evidenziata in linfociti T derivanti da sangue periferico in presenza o assenza di *T. cruzi* andando a valutare la loro reattività immunitaria. Normalmente l'aggiunta in coltura di antigeni, mitogeni, o anticorpi monoclonali anti-CD3 determina l'attivazione dei linfociti T periferici, ma, in presenza di *T. cruzi*, i linfociti T non sono attivati da nessuno di questi agenti (Tarleton, 1991).

Il difetto di questi linfociti è stato ricondotto ad una drammatica riduzione dell'espressione della subunità 55-kDa della subunità α del recettore per IL-2. Come osservato prima, l'alta affinità fra ligando e recettore si ha quando sono compresenti le subunità α , β e γ del recettore per IL-2. La subunità α è specifica per il legame citochinico. La co-coltura di linfociti T con *T. cruzi* e successiva colorazione con anticorpi anti-TAC fluoresceina-coniugati, legandosi alla subunità α , hanno evidenziato una diminuzione del livello di subunità α del 90% (Lopes et DosReis, 1995).

Sebbene il meccanismo attraverso il quale *T. cruzi* sopprime l'espressione della subunità α sia ancora sconosciuto, la soppressione può essere indotta nonostante l'interposizione di un filtro che impedisca il contatto tra linfociti e protozoi. Questa scoperta suggerisce come un fattore diffondibile funga da mediatore della soppressione. Tale fattore, una volta individuato, potrebbe avere numerose applicazioni cliniche per la regolazione del livello dei linfociti T attivati, in corso di leucemie e nelle malattie autoimmuni (Tarleton, 1991).

2.9 USO TERAPEUTICO DELLE CITOCHINE E DEI LORO RECETTORI

La disponibilità di citochine clonate purificate e di recettori solubili per le citochine offre la prospettiva di specifiche terapie cliniche capaci di modulare la risposta immunitaria.

Poche citochine finora, in particolare interferoni e fattori stimolanti le colonie, quali GM-CSF, hanno dimostrato di essere terapeuticamente utili.

Comunque, nonostante la promessa dell'utilizzo di citochine quali potenti mediatori immunitari o per ottenere altre risposte biologiche, non molte hanno fatto la loro comparsa nella pratica clinica. Svariati fattori fanno sollevare dei dubbi creando delle difficoltà nell'effettiva applicazione delle citochine nella pratica clinica per uso medico di routine (Dinarelli, 2003).

Uno di questi è la necessità di mantenere efficaci livelli al di sopra del quantitativo ritenuto clinicamente significativo e per un sufficiente intervallo di tempo.

Durante una risposta immunitaria, i linfociti interagendo l'un l'altro producono concentrazioni sufficientemente elevate di citochine in prossimità dei linfociti bersaglio, ma la realizzazione di tali concentrazioni di citochine quando la somministrazione avviene per via sistemica per il trattamento clinico è difficile. Da considerarsi inoltre che le citochine hanno spesso un breve emivita, tale per cui può essere richiesta una continua somministrazione.

Per esempio, l'IL-2 ricombinante umana ha una emivita di solo 7-10 minuti quando somministrata per via endovenosa.

Infine, le citochine sono estremamente potenti nel modificare la risposta biologica pertanto possono causare effetti collaterali imprevedibili e indesiderati. Gli effetti collaterali dovuti alla somministrazione di IL-2 ricombinante, per esempio, vanno da lievi (ad esempio, febbre, brividi, diarrea, e aumento di peso) a gravi, come ad esempio l'anemia, la trombocitopenia, lo shock, la dispnea e il coma.

Nonostante queste difficoltà, la promessa rappresentata dall'uso delle citochine nella pratica clinica è grande e gli sforzi per lo sviluppo di efficaci e sicure strategie citochine-correlate sono

destinate a non arrestarsi soprattutto in particolari settori come l'infiammazione, la terapia del cancro e la modulazione della risposta immunitaria in corso di trapianto d'organo, le malattie infettive e l'allergia.

Alcuni esempi specifici di vari approcci in procinto di essere esplorati includono il blocco del recettore citochinico, l'uso di analoghi citochinici e citochine-tossina coniugati (Dinarello, 2003).

Per esempio, la proliferazione dei linfociti Th attivati e l'attivazione di linfociti TC possono essere bloccate dall'anti-TAC, un anticorpo monoclonale che si lega alla subunità α ad alta affinità del recettore per IL-2. La somministrazione di anti-TAC ha prolungato la sopravvivenza nei trapiantati di cuore nella specie murina. Simili risultati sono stati ottenuti con analoghi dell'IL-2, che mantengono la loro capacità di impegnare il recettore dell'IL-2, ma hanno perso la loro attività biologica. Tali analoghi sono stati prodotti mediante mutagenesi di siti genici coinvolti nell'espressione di IL-2. Infine, tossine coniugate a varie citochine (ad esempio, la catena β della tossina difterica), hanno mostrato diminuire il rigetto di trapianti di rene e cuore negli animali. Tali coniugati contenenti IL-2 si legano selettivamente e uccidono i linfociti T helper attivati (Dinarello, 2003).

2.10 Interleuchina 1 beta (IL-1 β)

Introduzione

L'interleuchina 1 beta (IL-1 β) il più potente induttore pirogeno endogeno e uno dei maggiori fattori della cosiddetta 'risposta di fase acuta' tanto che questa molecola è stata descritta per la prima volta per il suo ruolo in tali ambiti (Merriman *et al.*, 1977). Inoltre IL-1 β è capace di agire come co-attivatore nella proliferazione dei linfociti, una proprietà meno palese rispetto al suo ruolo nel processo infiammatorio (Dinarello, 1999).

L'attività biologica che meglio caratterizza l'IL-1 β è la sua attività proinfiammatoria. Inoltre, l'importanza biologica e fisiopatologica di IL-1 β è stata maggiormente approfondita esaminando l'effetto determinato dal blocco dell'IL-1 β in modelli animali in corso di malattia. Poiché l'antagonista del recettore per IL-1 β (IL-1Ra) blocca il recettore IL-1R, qualsiasi riduzione nella gravità della malattia determinata da IL-1Ra è attribuibile al ruolo di IL-1 β in corso di patologia.

Struttura genica e proteica

L'analisi strutturale della forma matura di IL-1 β rivela che la molecola è composta esclusivamente da β pieghe (Priestly *et al.*, 1988).

IL-1 β ha due siti di legame al recettore IL-1 β di tipo I (IL-1 β RI). Vi è un sito di legame primario situato nella parte apicale della sua *forma a barile* (Gruetter *et al.*, 1994), che è simile ma non identica a quella di IL-1 α (Lambriola-Tomkins *et al.*, 1993) e poi vi è un secondo sito sul retro della molecola di IL-1 β (Gruetter *et al.*, 1994).

Anche IL-1Ra presenta due siti di legame simili a quelli di IL-1 β (Evans *et al.*, 1994; Vigers *et al.*, 1994). Tuttavia, la parte posteriore del sito di IL-1Ra è maggiormente omologa rispetto al sito principale di legame dell'IL-1 β (Evans *et al.*, 1994).

La formazione dell'eterodimero costituito da IL-1 β RI e recettore IL-1 β proteina accessoria (IL-1 β R AcP) (Greenfeder *et al.*, 1995), spiega probabilmente il fallimento di IL-1Ra nel far scattare il segnale.

Dalle differenze strutturali sopra descritte tra IL-1 β e IL-1Ra, si può desumere che il secondo sito di legame mancante in IL-1Ra è, in effetti, il sito che lega la proteina accessoria (Greenfeder *et al.*, 1995).

Sono state rilevate notevoli omologie fra IL-1 β e il fattore di crescita acido dei fibroblasti (Murzin *et al.*, 1992) e l'IL-18 (Okamura *et al.*, 1995).

La struttura a botte di IL-1 β è in modo curioso strettamente correlata a quella del fattore di crescita dei fibroblasti (Murzin *et al.*, 1992), che possiede infatti alcune attività simili all'IL-1 β . Dal momento che ogni membro della famiglia di IL-1 si lega agli stessi recettori per IL-1 β , non è sorprendente che IL-1 β , IL-1 α e IL-1Ra condividano la stessa tipologia strutturale. Per esempio, Arg4 e Arg12 di IL-1 α e IL-1 β mature rispettivamente, sono necessarie per l'attività biologica ed entrambe le arginine occupano la stessa posizione nelle rispettive strutture cristallografiche (Nanduri *et al.*, 1991).

Ne consegue che IL-1 α è in grado di agire come un antagonista recettoriale di risposte biologiche verso IL-1 β (Boraschi *et al.*, 1990).

Il principale prodotto di trasduzione del gene dell'IL-1 β è un precursore 31 kDa nel quale manca il peptide segnale.

Il precursore dell'IL-1 β richiede il clivaggio intracellulare da parte dell'enzima di conversione dell'IL-1 β (ICE) (Black *et al.*, 1988), noto anche come caspase 1 (Alnemri *et al.*, 1996). La

forma matura dell'IL-1 β , del peso molecolare 17,5 kDa, presenta una sequenza N-terminale all'altezza dell'alanina 117 (Ala117) ed è biologicamente attiva.

In seguito alla sintesi, il precursore di IL-1 β rimane principalmente a livello di citosol fino a quando non viene scisso e trasportato fuori dalla cellula. Parte dell'IL-1 β si trova nei lisosomi (Bakouche *et al.*, 1987) o associata ai microtubuli (Rubartelli *et al.*, 1990; Stevenson *et al.*, 1992). Entrambe le localizzazioni possono svolgere un ruolo nella secrezione di IL-1 β .

La morte e la rottura delle cellule infiammatorie non è un evento insolito *in vivo*. Ci sono diversi siti nella porzione N-terminale di 16 kDa della proIL-1 β , che sono vulnerabili al clivaggio nelle vicinanze dell'Ala117 da parte di enzimi. Questi sono tripsina, elastasi, chimotripsina, una chimasi dei mastociti e una varietà di proteasi (Hazuda *et al.*, 1990, 1991), enzimi che si trovano comunemente in fluidi infiammatori. Anche la proteinasi 3 taglia il precursore di IL-1 β dando vita alla molecola attiva (Coeshott *et al.*, 1999).

L'importanza del ruolo che queste proteasi svolgono nella conversione *in vivo* di proIL-1 β in forme mature è poco chiaro, ma rimane il fatto che generano forme biologicamente attive di IL-1 β .

Nel corso dei vari studi sul recettore solubile di tipo II dell'IL-1 β , si è rilevato che l'affinità di proIL-1 β per questo recettore solubile è alta e può impedire la scissione accidentale del precursore ad opera di questi enzimi nei fluidi infiammatori.

Fonti cellulari ed espressione tissutale

Le fonti primarie di IL-1 β sono monociti, macrofagi e cellule dendritiche. Anche linfociti B e le cellule NK sono in grado di produrre IL 1 beta.

I cheratinociti sono in grado di produrre tale citochina quando stimolati, anche se queste cellule di base esprimono IL-1 β mentre fibroblasti e cellule epiteliali in genere non producono IL-1 β .

In soggetti sani, i monociti circolanti del sangue o del midollo osseo non esprimono quantità rilevabili di IL-1 β (Mileno *et al.*, 1995; Dinarello e Shapiro, 1997; Puren *et al.*, 1999).

Gli studi indicano che una notevole espressione di IL-1 β in soggetti sani è attribuibile all'attivazione del processo trascrizionale dell'IL-1 β dal contatto di superficie (Schindler *et al.*, 1990a).

Inoltre sembra esserci una espressione basale di IL-1 β nell'ipotalamo umano (Breder *et al.*, 1988). Molti tumori maligni esprimono IL-1 β come espressione della loro natura neoplastica, compresa la leucemia mieloide acuta (Wetzler *et al.*, 1994) e la leucemia mieloblastica giovanile (Schirà *et al.*, 1993).

Quasi tutti i microbi e prodotti di origine microbica inducono la produzione di IL-1 β . A seconda dell'agente stimolante, i livelli di mRNA per IL-1 β aumentano rapidamente, entro 15 minuti, ma iniziano a diminuire dopo 4 ore. Questa diminuzione è ritenuta essere dovuta alla sintesi di un repressore di trascrizione o ad una diminuzione dell'emivita dell'mRNA (Jarrous e Kaempfer, 1994).

Mediante l'uso di IL-1 β quale stesso stimolante della propria espressione genica, sono stati mantenuti livelli di IL-1 β mRNA per più di 24 ore (Schindler *et al.*, 1990b; Serkkola e Hurme, 1993). Crescenti livelli di AMP ciclico in queste stesse cellule mediante istamina aumentano l'espressione genica e proteica di IL 1 β (Vannier e Dinarello, 1993).

In cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), l'acido retinoico induce l'espressione genica di IL-1 β , ma il principale precursore trascrizionale non riesce a determinare un mRNA maturo (Jarrous e Kaempfer, 1994).

L'inibizione della traduzione da cicloesimide risulta in un maggior *splicing* degli esoni, nell'escissione degli introni e in un aumento dei livelli di mRNA maturo (superinduzione).

Pertanto, la sintesi di mRNA maturo per IL-1 β richiede un passo di attivazione per superare uno apparentemente intrinseco processo di inibizione esercitato dal precursore dell'mRNA.

Stimolanti come la componente del complemento C5a (Schindler *et al.*, 1990c), l'ipossia (Ghezzi *et al.*, 1991), l'aderenza alle superfici (Schindler *et al.*, 1990a) o la coagulazione del sangue (Mileno *et al.*, 1995) inducono la sintesi di grandi quantità di mRNA codificante per IL-1 β in monociti senza significative trasduzioni in IL-1 β proteica.

Questa dissociazione tra trascrizione e trasduzione è caratteristica di IL-1 β , ma anche del TNF (Schindler *et al.*, 1990a).

Sembra che gli stimoli visti sopra non siano sufficienti nel fornire un segnale per la trasduzione, nonostante un forte segnale di trascrizione. Senza essere trasdotto la maggior parte di mRNA per IL-1 β vanno incontro a degradazione.

L'aggiunta di endotossina batterica o IL-1 β stessa a cellule con elevati livelli di mRNA per IL-1 β risulta in un aumento di trasduzione (Schindler *et al.*, 1990a, 1990c).

Una spiegazione è la stabilizzazione di regioni ricche in AU nella regione non codificante 3' che avviene in cellule stimolate con LPS. Queste sequenze ricche di AU sono note per sopprimere la normale sintesi di emoglobina. La stabilizzazione del mRNA da parte di prodotti microbici può spiegare il motivo per cui le basse concentrazioni di LPS o pochi batteri inducono la trasduzione di grandi quantità di IL-1 β (Miller *et al.*, 1992).

Un'altra spiegazione è che IL-1 β stabilizza il proprio mRNA (Schindler *et al.*, 1990b) impedendo la deadelinazione, come già avviene per le chemochine GRO (Stoeckle e Guan, 1993).

Studi hanno utilizzato composti piridinil-imidazolici che bloccano la sintesi di IL-1 β senza alterare la trascrizione dei livelli di mRNA. Livelli di mRNA per IL-1 β e per TNF in PBMC stimolati con LPS in presenza di questi composti sono indistinguibili da quelli in PBMC stimolati con C5a, ipossia o adesione. In altre parole, vi è una imponente produzione di mRNA citochinico ma non di proteine.

Questi interessanti composti sono stati utilizzati in medicina clinica. Alcuni sono inibitori delle cicloossigenasi / lipossigenasi perché vanno a bloccare questi enzimi. Di conseguenza, essi sono spesso chiamati 'inibitori in doppio'. Tuttavia, il loro meccanismo d'azione e la repressione verso IL-1 β e TNF non è mai stata legata alla loro capacità di sopprimere lipossigenasi o cicloossigenasi (Sirko *et al.*, 1991).

Attività *in vitro*

La più importante molecola di regolamentazione per IL-1 β è l'IL-1Ra (Arend *et al.*, 1998).

Gli stimolatori della produzione di IL-1 β non sono comuni, mentre inibitori naturali includono IFN α e IFN γ .

Per esempio, IFN γ inibisce l'IL-1 β indotta da PGE2 in monociti di sangue umano (Browning e Ribolini, 1987). o indotta da IL-1 β stessa mentre IFN α inibisce l' IL-10 indotta da IL-1 β (Schindler *et al.*, 1990b).

Nelle colture di condrociti, IFN riduce l'espressione di collagenasi 1 indotta da IL 1 (Andrews *et al.*, 1989, 1990). In macrofagi provenienti dal liquido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide IFN ha determinato una inibizione nella produzione spontanea di IL-1 β (Ruschen *et al.*, 1989).

Sebbene IL-10 inibisca la sintesi di IL-1 β , essa non inibisce la produzione di IL-1Ra.

Ci sono una serie di rapporti che si concentrano sulla capacità di IL-10 nel sopprimere l'espressione genica e la sintesi di citochine infiammatorie (Moore *et al.*, 1993). Il segnale cellulare conseguente al legame fra IL-10 e il suo recettore include la fosforilazione di JAK1 e

TYK2, in maniera molto simile a quello di IFN. Alcuni studi hanno dimostrato che IL-10 inibisce la traslocazione di NF κ B. La maggior parte degli studi sulle proprietà antinfiammatorie di IL-1 β si sono concentrati sulla soppressione delle citochine prodotte dai macrofagi. L'IL-10 sopprime IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-1 β 2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIP-1, RANTES, LIF e IL-10 stessa. Espianti di sinovia reumatoide umana rilasciano IL-1 β e TNF α tanto quanto IL-10. Tuttavia, una specifica neutralizzazione di IL-10 si traduce in un aumento della produzione di IL-1 β e TNF α , suggerendo che l'IL-10 prodotta a livelli basali nella sinovia in corso di artrite reumatoide, agisce come un soppressore naturale nella produzione di IL-1 β e TNF α (Katsikis *et al.*, 1994).

IL-13 e TGF β inibiscono la produzione di IL-1 β (Vannier *et al.*, 1996). IL-6, anche se si trova in una varietà di patologie infiammatorie, ematologiche e malattie infettive, sopprime la cicloossigenasi inducibile attraverso IL-1 β (Hauptmann *et al.*, 1991).

Allo stesso modo di IL-6, CNTF si lega al suo specifico recettore solubile, e quando incubati con PBMC da sangue umano, il complesso CNTF/recettore solubile sopprime l'IL-8 indotta da IL-1 β e la sintesi di PGE2 (Shapiro *et al.*, 1994).

Attività *in vivo*

Poiché le mutazioni a carico del gene per IL-1 β risultano in topi fenotipicamente normali, non vi è probabilmente nessun ruolo fisiologico normale per IL-1 β in soggetti sani. Topi IL-1 β -deficienti dopo 4 anni di vita, non presentano segni anomali nella prole di una maggiore suscettibilità a malattia o rapido invecchiamento.

Tuttavia, topi deficienti per IL-1 β mostrano alcune differenze rispetto ai loro controlli wild-type. Il più drammatico è la risposta di infiammazione locale seguita da una iniezione sottocutanea di trementina. Entro le prime 24 ore, topi IL-1 β -deficienti iniettati con trementina non manifestano una risposta di fase acuta, non sviluppano anoressia, non hanno IL-6 circolante e non hanno febbre (Zheng *et al.*, 1995; Fantuzzi *et al.*, 1997a). Questi risultati sono coerenti con quelli riportati nello stesso modello utilizzando anticorpi anti-IL-1R di tipo I in topi *wild-type* (Gershenwald *et al.*, 1990).

Topi IL-1 β -deficienti hanno anche ridotto la peritonite indotta da zimosano (Fantuzzi *et al.*, 1997b). Ulteriori studi hanno inoltre rilevato che topi IL-1 β -deficienti presentano elevate risposte febbrili in seguito a somministrazione di IL-1 β e IL-1 α (Alheim *et al.*, 1997). Inoltre, sembra che vi sia una certa riduzione della temperatura corporea e cambiamenti comportamentali.

Topi deficienti per IL-1 β iniettati con LPS hanno poca o assente espressione di leptina mRNA o proteica (Faggioni *et al.*, 1998). In topi gravidi IL-1 β -deficienti vi è una normale risposta a parto prematuro LPS-indotto, ma in questi topi ci sono diminuiti livelli di citochine LPS indotti a livello uterino (Reznikov *et al.*, 1999). La riduzione di citochine LPS-indotte non viene riscontrata in topi non gravidi IL-1 β -deficienti, a suggerire che la combinazione di cambiamenti ormonali in gravidanza e lo stato di deficit di IL-1 β agiscono insieme per ridurre i tempi di risposta di LPS. Il meccanismo per la ridotta produzione di citochine in topi IL-1 β -deficienti in corso di gravidanza sembra essere una riduzione del livello costitutivo della componente p65 del NF κ B (Reznikov *et al.*, 2000).

A differenza del TNF α , anche grandi dosi di IL-1 β non determinano morte. Tuttavia, topi adrenalectomizzati hanno aumentato la sensibilità agli effetti letali di IL-1 β (Bertini *et al.*, 1988). L'iniezione di IL-1 β in primati induce neutrofilia e sintesi di proteine di fase acuta mentre in topi induce febbre, anoressia e l'immissione in circolo di IL-6.

Anche se ci sono molte interazioni fra IL-1 β e altre citochine, la piú dimostrata e clinicamente rilevante è la sinergia fra IL-1 β e TNF α . Nei conigli, questa sinergia si è manifestata con un grave stato shock-simile, distress respiratorio acuto e la morte (Okusawa *et al.*, 1988). In realtà, vi sono alcuni esempi in cui la sinergia tra IL-1 β e del TNF α non è stata dimostrata. Questi includono la radioprotezione, reazione di Shwartzman, sintesi di PGE2, la produzione di ossido nitrico, la sintesi del fattore di crescita dei nervi, la significativa perdita di massa corporea e la sintesi di IL-8 e altre chemochine.

Gli inibitori endogeni dell'attività mediata dall'IL-1 β sono TGF β , IL-10, IFN γ , IFN α , IL-13 e dei membri della famiglia gp130 (IL-6 e CNTF).

Test altamente sensibili per la rilevazione di IL-1 β nella circolazione ematica di uomini in salute rivelano livelli inferiori a 10 pg / ml. A seguito di una iniezione di LPS in uomini sani, i livelli di IL-1 β aumentano nella circolazione da 3 a 6 ore dopo e poi ritornano a livelli basali (Cannon *et al.*, 1990).

Tuttavia, a differenza di IL-6, TNF α o di IL-8, i livelli di IL-1 β sono notevolmente bassi nelle malattie umane. Anche in pazienti con sepsi grave, i livelli di IL-1 β circolante sono basse (Casey *et al.*, 1993). Tuttavia, questi livelli correlano con la gravità della malattia (Casey *et al.*, 1993; Dinarello *et al.*, 1993).

Questo può essere spiegato dal momento che IL-1 β è una molecola molto potente quando è presente in circolazione.

Nonostante gli effetti sistemici di IL-1 β siano stati normalmente studiati negli animali, IL-1 β è stato iniettato in pazienti con vari tumori solidi come parte di una strategia per la ricostituzione e il trapianto di midollo osseo.

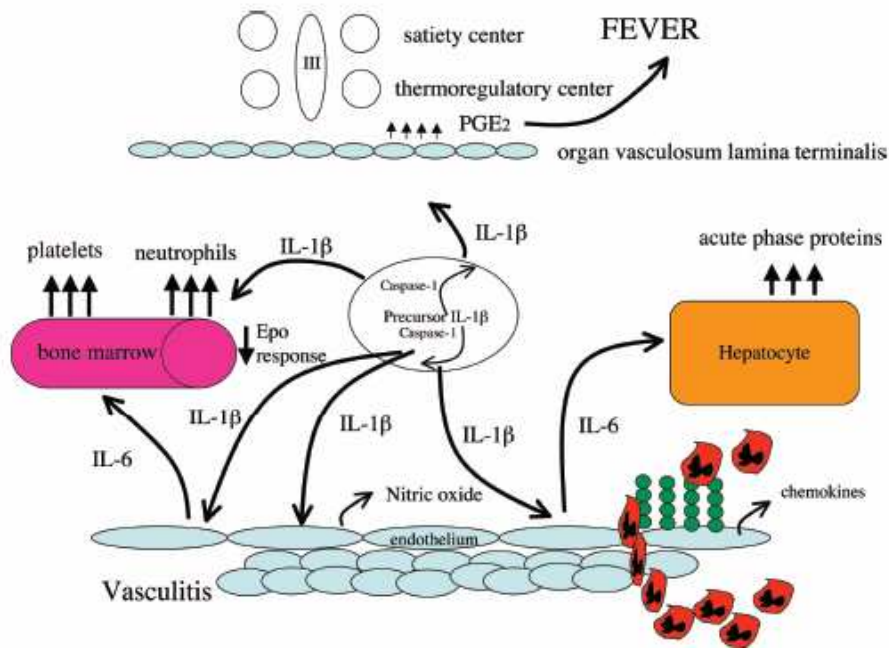


Fig. 2.4 Manifestazioni sistemiche di IL-1 β (Dinarello, 2005).

La tossicità acuta determinata da IL-1 β è stata maggiore per via endovenosa se comparata alla via sottocutanea; all'iniezione sottocutanea è stato associato un significativo dolore locale, eritema e gonfiore (Kitamura e Takaku, 1989; Laughlin *et al.*, 1993). Brividi e febbre sono osservati in quasi tutti i pazienti (Tewari *et al.*, 1990). La risposta febbrile aumenta con l'aumentare del dosaggio (Corona *et al.*, 1991, 1993; Smith *et al.*, 1992, 1993; Nemunaitis *et al.*, 1994).

In pazienti in trattamento con IL-1 β (Corona *et al.*, 1991; Nemunaitis *et al.*, 1994), si è rilevata una significativa ipotensione. Pressione arteriosa sistolica è diminuita costantemente 3-5 ore dopo l'infusione di IL-1 β .

In seguito alla somministrazione di IL-1 β si ha un forte aumento dei livelli di cortisolo 2-3 ore dopo l'iniezione.

Vi è un calo di glucosio nel siero entro la prima ora dalla somministrazione (Corona *et al.*, 1991). Non sono stati osservati cambiamenti nei parametri di coagulazione come ad esempio tempo di protrombina, di tromboplastina parziale, fibrinogeno o prodotti di degradazione. Quest'ultimo risultato è da considerare in contrapposizione all'infusione di TNF α in uomo sano, che si traduce in una sindrome distinta coagulopatia (Van der Poll *et al.*, 1990).

Non inaspettatamente, l'infusione di IL-1 β in umani fa aumentare significativamente i livelli di IL-6 circolante in maniera dose-dipendente. Un soggetto al quale viene iniettata IL-1 β (Bargetzi *et al.*, 1993) mostra un rapido aumento di IL-1Ra circolante e dei recettori solubili per TNF α (p55 e p75). I livelli plasmatici di IL-6 raggiungono picchi di 25 pg / ml mentre IL-8 raggiunge un picco di 311 pg / ml dopo 2 ore. C'è stato anche un aumento statisticamente significativo nel plasma di nitriti / nitrati ed una neutrofilia IL-1 β -indotta dopo 5 ore.

Numerosi studi in vitro hanno coinvolto il ruolo di IL-1 β nella patogenesi dell'artrite reumatoide. Questi sono basati su espianti di tessuto incubato e linee di cellule con IL-1 β e la misurazione della produzione di PGE₂, metalloproteinasi, collagenasi, chemochine e sintesi di diverse altre citochine.

Anche vari modelli animali di malattia infiammatoria si sono concentrati sull'IL-1 β come fattore chiave nella malattia. Per esempio, l'infusione di IL-1 β nello spazio articolare di conigli sani determina infiammazione e perdita di tessuto osseo e cartilagineo (Feige *et al.*, 1989). Altri modelli includono l'infiammazione indotta da parete cellulare batterica.

In topi geneticamente modificati *l'over expression* di TNF α fa sviluppare una spontanea artrite reumatoide con lesioni a carico articolare e progressiva infiammazione, proliferazione cellulare e la distruzione ossea. Sebbene questi risultati suggeriscano che TNF α media il rimodellamento del tessuto patologico della malattia, quando questi topi sono trattati con anticorpi per IL-1R di tipo I, la malattia è drasticamente ridotta. In realtà, nei topi in cui vi è una *over* espressione di TNF α ma deficienti di IL-1R di tipo I, vi è una limitata malattia (Siegel *et al.*, 1995). Questi risultati sono estremamente coerenti con la consolidata capacità di TNF α nell'indurre IL-1 β (Dinarello *et al.*, 1986b). Utilizzando espianti da sinovia di pazienti con artrite reumatoide, gli anticorpi anti TNF α riducono la produzione spontanea di IL-1 β (Brennan *et al.*, 1989).

Il dato più forte di un ruolo centrale esercitato dall'IL-1 β nell'artrite reumatoide è che la somministrazione di anticorpi anti-IL-1 β (Gieger *et al.*, 1993) o di IL-1Ra ha ridotto l'intensità e la natura distruttiva della malattia. Il trattamento di ratti con IL-1Ra colpiti da artrite collagene-indotta risultava in una quasi completa soppressione di tutti i parametri della malattia (Bendele *et al.*, 1999). In generale, bloccando l'IL-1 β con IL-1Ra in corso di artrite collagene-indotta dopo lo stabilirsi della malattia risulta in una diminuita distruzione del tessuto articolare rispetto al blocco del TNF α (van den Berg, 1998).

Il modello sistemico fornito per l'endotossiemia potrebbe non essere ottimale per test clinici di utilità appropriata nella terapia anti-citochine per malattie umane. Tuttavia, i risultati di questi studi fanno luce sulle azioni di blocco delle citochine in un modello di sindrome da risposta infiammatoria sistemica comunemente denominato *SIRS*. Il pretrattamento di soggetti con IL-1Ra prima della somministrazione endovenosa di endotossina non riduce la febbre o sintomi sistemici, anche se si nota una modesta ma statisticamente significativa riduzione dei neutrofili circolanti (Granowitz *et al.*, 1993).

In un altro studio, i volontari sono stati pretrattati con solubile IL-1R di tipo I o placebo e poi iniettati con endotossina. Anche in questo caso, nessun effetto sulla febbre o sintomi sistemici sono stati notati. Anche se vi è stata una diminuzione del livello di circolante IL-1 β rispetto ai volontari trattati con placebo, vi è stato anche un calo del livello di IL-1Ra circolante a causa del complesso del recettore solubile di IL-1Ra endogeno (Preas *et al.*, 1996).

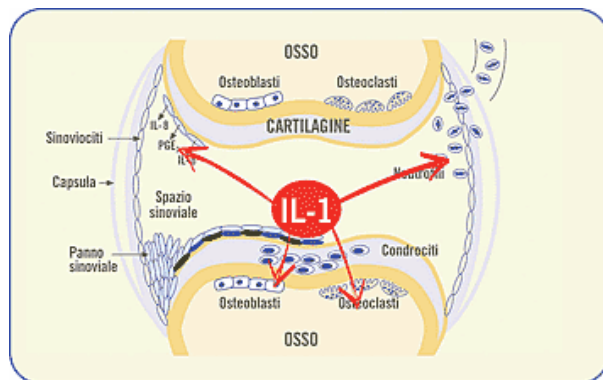
Questo effetto è dose-dipendente e ha determinato una notevole diminuzione di IL-1Ra endotossina-indotto. Alte dosi di IL-1R solubile di tipo I sono state associate anche a più elevati livelli circolanti di TNF α e IL-8, nonché ad un aumento dell'IL-1 β cellulo-associata (Preas *et al.*, 1996). Questi risultati supportano il concetto che l'IL-1R solubile di tipo I si lega all'IL-1Ra endogeno e riduce l'efficacia biologica di questo antagonista naturale dell'IL-1 β .

Una analisi di sopravvivenza eseguita su pazienti con notevoli disfunzioni organiche non ha rilevato alcuna differenza nella probabilità di sopravvivenza mediante somministrazione di IL-1Ra. Queste analisi sostengono la tesi secondo cui

- la somministrazione di IL-1Ra in pazienti in pericolo di vita è sicura,
- vi è un piccolo ma costante miglioramento della sopravvivenza con IL-1Ra,
- non vi sono pazienti con particolari condizioni che chiaramente possano beneficiare del trattamento con IL-1Ra,
- il gruppo di pazienti, anche se con un miglioramento della sopravvivenza, è troppo eterogeneo per mostrare differenze statisticamente significative.

Risultati simili sono stati riportati in seguito a terapie basate su anticorpi anti-TNF α - in questi pazienti (Abraham *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 1996). Una terapia potrebbe essere quella di combinare IL-1Ra con strategie anti-TNF α per il trattamento di shock settico.

Utilizzato in corso di artrite reumatoide (**fig 2.5**) per un arco di 6 mesi, metà dei pazienti trattati con IL-1Ra mostrava notevoli miglioramenti.



E' stato osservato una diminuzione nel numero e nel grado di dolorabilità delle articolazioni infiammate. Inoltre, vi è stata una riduzione dose-dipendente del livello di proteina C-reattiva e della velocità di sedimentazione eritrocitaria.

Il tasso di progressione radiologica in pazienti in trattamento con IL-1Ra è stato significativamente inferiore rispetto al gruppo trattato con placebo (Torcia *et al.*, 1996)..

Fig 2.5 Azione dell'IL 1 β in corso di srtrite reumatoide

Pazienti trattati per più di 3 anni con IL-1Ra non hanno mostrato un aumento di infezioni o tumori.

Un altro *trial* con IL-1Ra in pazienti con artrite reumatoide è stato utilizzato in pazienti che hanno subito trattamenti con metotexate a differenti dosi associato a IL-1Ra.

IL-1R solubile di tipo I è stato somministrato per via sottocutanea a pazienti con artrite reumatoide attiva. Sebbene 4 di 8 pazienti che ricevevano 1000 g/m²/die hanno mostrato miglioramento in almeno una misura dell'attività della malattia, solo 1 di questi 4 pazienti ha mostrato un miglioramento clinico (Drevlow *et al.*, 1996). In modo analogo a pazienti trattati con placebo, dosi più basse del recettore non hanno prodotto alcun miglioramento. Nonostante la mancanza di miglioramento clinico, l'espressione di IL-1 β sulla superficie dei monociti è stato significativamente ridotta in tutti i pazienti che hanno ricevuto IL-1R solubile di tipo I. Anche gli altri parametri di alterata funzionalità immunitaria comuni nei pazienti con artrite reumatoide hanno mostrato una riduzione. Una possibile spiegazione per la mancanza di risposta clinica, nonostante l'efficacia e la repressione delle risposte immunitarie, potrebbe essere l'inibizione di IL-1Ra endogeno. Questa è stata osservata in volontari riceventi IL-1R solubile di tipo I prima del *challenge* con endotossina (Preas *et al.*, 1996).

Terapia

Ci sono tre usi terapeutici per IL-1 β :

1. pretrattamento prima di prove tossiche o addirittura letali;
2. come stimolatore del midollo osseo;
3. come coadiuvante per i vaccini.

In generale, il pretrattamento di animali con basse dosi di IL-1 β conferisce protezione o riduce la gravità di un ulteriore *challenge*. La prova può essere una infezione letale, un agente infiammatorio o l'induzione di un processo autoimmune.

Per esempio, la somministrazione di IL-1 β a topi neutropenici 24 ore prima dell'infezione letale da *Pseudomonas* prolunga in maniera significativa la sopravvivenza, anche quando gli animali sono trattati con antibiotici appropriati (van der Meer *et al.*, 1988).

In particolare per essere efficace nel proteggere la somministrazione di IL-1 β deve avvenire prima dell'infezione mentre la somministrazione al momento della sfida non ha alcun effetto o addirittura peggiora la malattia. Animali utilizzati nella maggior parte degli studi sono sani e non immunocompromessi.

In animali sani, un singolo pretrattamento con IL-1 β ha ridotto l'ipotensione, la conta di colonia per organo e la mortalità per infezione causata da molteplici batteri.

La protezione è spesso segnalata per dosi letali di LPS ed è stata anche osservata in infezioni miste derivanti da legatura e puntura ciecale.

Il pretrattamento con IL-1 β protegge contro l'ulcera gastroduodenale e la malattia infiammatoria cronica intestinale (Cominelli *et al.*, 1990). In modelli di lesioni polmonari, il pretrattamento con IL-1 β prolunga di molto la sopravvivenza dopo l'esposizione letale a iperossia (Tsan *et al.*, 1991), riduce l'edema e infiltrazione neutrofila dopo l'iniezione di *E. coli* e la broncocostrizione dopo iniezione intratracheale in cavie sensibilizzate (Vannier *et al.*, 1989). Le lesioni conseguenti a riperfusione dopo ischemia miocardica sono evitate dal pretrattamento con IL-1 β (Maulik *et al.*, 1993).

I livelli di TNF α circolante indotti da LPS sono ridotti da una prima iniezione di IL-1 β (Vogels *et al.*, 1994). Una protezione simile è stata osservata in animali immunocompromessi con neutropenia, infezioni virali, stress esogeni e topi geneticamente immunodepressi.

Non vi è alcuna prova che l'IL-1 β svolga un ruolo nella normale ematopoiesi. I topi IL-1 β - deficienti sono privi di evidenti alterazioni ematologiche. Un ruolo caratterizzante l'IL-1 β nell'ematopoiesi è la sua capacità di aumentare la produzione di CSF e fattori riguardanti le cellule staminali, aumentando la loro trascrizione o la stabilizzazione del loro mRNA. Un'unica bassa dose di IL-1 β è in grado di proteggere fino al 90% di topi esposti a radiazioni letali (Moreb *et al.*, 1989). Diversi meccanismi possono spiegare la capacità di IL-1 β nel proteggere le cellule del midollo osseo; questi includono un effetto protettivo su cellule staminali pluripotenti, cellule staminali mieloidi e cellule progenitrici. Inoltre, possono essere coinvolti l'arresto del ciclo cellulare e l'incremento di Mn superossido dismutasi e altri antiossidanti (Zucali *et al.*, 1994).

IL-1 β aumenta l'espressione genica e la sintesi di c-kit in cellule del midollo osseo, e questo si pensa essere la spiegazione della sinergia fra IL-1 β e fattore delle cellule staminali nella protezione contro radiazioni letali (Neta *et al.*, 1994).

Modelli animali di mielosoppressione spesso includono IL-1 β come parte del protocollo di recupero e studi nel trapianto di midollo hanno dimostrato come una singola iniezione di IL-1 β a basso dosaggio multilineare accelera il recupero (Tiberghien *et al.*, 1993).

IL-1 β è un potente immunoadiuvante. Esso innesca *in vivo* una maggiore risposta anticorpale secondaria in topi stimolati da antigeni proteici. L'attività è stata rilevata essere tempo e dose-dipendente. L'effetto è stato ottenuto quando IL-1 β è stato iniettato 2 ore dopo la dose *priming* di antigeni (Staruch *et al.*, 1983). Gli studi di IL-1 β come coadiuvante per i vaccini hanno considerato anche gli effetti esercitati dal nonapeptide dalla sequenza di IL-1 β (163-171) (Antoni *et al.*, 1986, 1989; Boraschi *et al.*, 1992).

Il vantaggio del nonapeptide rispetto all'IL-1 β è stato una ridotta tossicità. Tuttavia, la tossicità per IL-1 β può essere inferiore quando tale citochina viene utilizzata per l'immunizzazione delle mucose. Anche il nonapeptide sintetico VQGEESENDK ha mostrato *in vivo* capacità immunomodulatorie qualitative e quantitative paragonabili a quelle dell'IL-1 β proteica umana matura, ma non ha causato alcun cambiamento metabolico associato ad infiammazione evidenziati invece da tutta la molecola IL-1 β *in vivo* (Boraschi *et al.*, 1988).

Per evitare la tossicità di IL-1 β , è stata riportata l'immunizzazione della mucosa. IL-1 β è stato efficace allo stesso modo dell'adiuvante più comunemente usato e studiato a livello di mucose quale è la tossina del colera nell'induzione di IgG sieriche e IgA e IgG vaginali antigeni specifiche (Staats *et al.*, 1999). IL-1 β è stato somministrato per via intranasale con proteine antigeniche solubili. Questi risultati indicano che IL-1 β , può essere utile come coadiuvante per vaccini mucosali.

Lo spettro di modelli patologici di protezione in cui questo fenomeno si verifica non suggerisce un meccanismo comune. Poiché il blocco dell'attività di IL-1 β converte infezioni subletali di *Listeria monocytogenes* ad un'infezione letale (Havell *et al.*, 1992; Rogers *et al.*, 1992), sono stati proposti meccanismi in grado di incrementare l'attività battericida legata all'IL-1 β .

È chiaro di come sia necessario un periodo di tempo preciso tra somministrazione di IL-1 β e il *challenge*, presumibilmente per il verificarsi delle modifiche cellulari, la sintesi delle proteine o la produzione di altre molecole con proprietà protettive. In generale, il pretrattamento con IL-1 β prima di una *challenge* letale induce uno stato di resistenza cellulare e organica alla morte.

L'IL-1 β indotta da proteine derivanti da shock termico (Freshney *et al.*, 1994), da altre proteine di fase acuta (Vogels *et al.*, 1993) o da antiossidanti (Tsan *et al.*, 1991) potrebbero contribuire a questo stato.

Perché IL-1 β è un potente induttore del PLA2 e la COX-2, la produzione endogena di PGE2 può migliorare gli effetti di IL1 stessa. Infatti, la protezione in patologie infiammatorie cronica intestinale, l'ipersensibilità cutanea e condizioni ulcerogena è mediata dalla sintesi delle prostaglandine indotta da IL-1 β . Inoltre la somministrazione contemporanea di inibitori della cicloossigenasi e il pretrattamento con IL-1 β determina una protezione contro la tossicità letale dell'ossigeno (White *et Ghezzi*, 1989).

Anche quando IL-1 β viene somministrata per ridurre una lesione, la protezione può essere migliorata mediante la somministrazione di PGE2 libere o vincolate ai liposomi (Leff *et al.*, 1994). D'altro canto, in altri modelli di infezione (van der Meer *et al.*, 1988) e di radioprotezione (Neta, 1990), le prostaglandine non sono chiaramente coinvolte.

In alcuni modelli di infezione batterica, l'induzione di corticosteroidi sembra essere richiesta affinché venga abolito l'effetto protettivo di IL-1 β in topi adrenalectomizzati (Fantuzzi e Ghezzi, 1993). In un modello non letale, i livelli di TNF α circolante indotti da LPS sono ridotti in topi pretrattati con una bassa dose singola di IL-1 β (LeContel *et al.*, 1992; Vogels *et al.*, 1994); in questo modello, l'induzione di corticosteroidi sembra mediare l'effetto protettivo di IL-1 β (LeContel *et al.*, 1992).

Un considerevole numero di dati supportano il ruolo dell'IL-1 β indotta da corticosteroidi endogeni come meccanismo di protezione IL-1 β -indotta (Fantuzzi e Ghezzi, 1993).

La capacità di IL-1 β nell'indurre molti antiossidanti è stata coinvolta come parte del meccanismo di protezione. Nel ratto, la protezione IL-1 β -indotta contro la tossicità letale di ossigeno è associata ad un aumento di catalasi, glutatione, e Mn, Cu e Zn superossido dismutasi (Tsan *et al.*, 1991).

Meccanismi analoghi sono stati proposti per la protezione delle cellule staminali del midollo osseo (Moreb *et al.*, 1989; Moreb e Zucali, 1992). In un modello di ischemia cardiaca-riperfusiva, un incremento in questi antiossidanti e di proteina shock calore 27 si pensa sia alla base della protezione offerta da IL-1 β (Maulik *et al.*, 1993).

Negli esseri umani, una singola iniezione di IL-1 β induce livelli circolanti di IL-1Ra e recettori solubili per TNF α (Tilg *et al.*, 1994). Nei topi, una singola bassa dose di IL-1 β induce mRNA codificante per IL-1Ra in vari organi e diminuisce i livelli di mRNA per il recettore p55 del TNF α (Vogels *et al.*, 1994).

Presi insieme, la *downregulation* di questi recettori mediante pretrattamento con IL-1 β desensibilizza le cellule contro i danni da IL-1 β e TNF α . Inoltre, la produzione di IL-1Ra e la liberazione dei recettori TNF α solubili riducono ulteriormente l'attività di IL-1 β e TNF α .

IL-1 β agisce in sinergia con una varietà di CSF. In realtà, l'emopoietina-1, un fattore che agisce in sinergia con CSF, è conseguente all'IL-1 β .

La sinergia è maggiormente evidente sulla cultura *ex vivo* arricchita con cellule CD34+. Nell'espansione *ex vivo* di cellule CD34 + derivanti da sangue periferico, l'IL-1 β è spesso aggiunta alle culture insieme con IL-3 e di altri CSF (Brugger *et al.*, 1993).

Il trattamento di cellule endoteliali derivanti dal midollo osseo con IL-1 β aumenta l'aderenza di cellule progenitrici CD34+, che possono svolgere un ruolo importante nel regolare il traffico di cellule staminali pluripotenti (Rafii *et al.*, 1994). Cellule staminali purificate di topo richiedono IL-3, IL-6 e IL-1 β per la proliferazione *in vitro* (Heimfeld *et al.*, 1991), il che suggerisce che le cellule staminali primitive richiedono più segnali di crescita.

I meccanismi di IL-1 β quale coadiuvante includono l'induzione di IL-6 come attivatore dei linfociti B, l'induzione di chemochine per attirare le cellule immunocompetenti nel sito immunogeno e l'induzione di altre citochine coinvolte nella risposta immunitaria

2.11 Interleuchina 2 (IL 2)

Introduzione

L'interleuchina 2 (IL-2), originariamente chiamata "fattore di crescita dei linfociti T", è stata la prima citochina ad essere isolata, purificata e caratterizzata a livello molecolare.

Strutturalmente IL-2 è il prototipo di alcune interleuchine quali citochine ematopoietiche e di alcuni dei più classici ormoni, quali l'ormone della crescita e la prolattina. Ciò dato dal fatto che presenta una struttura glicoproteica globulare, composta di quattro eliche antiparallele.

Funzionalmente, l'IL-2 è un po' atipica come interleuchina, poiché la sua produzione è limitata ai soli linfociti T antigene- o mitogeno-attivati, e la sua azione è limitata a linfociti T antigene-attivati e cellule *Natural Killer* (NK).

IL-2 favorisce la proliferazione, differenziazione e sopravvivenza di queste cellule bersaglio, tale per cui la sua presenza è vincolante per un regolare sviluppo della risposta immunitaria cellulare antigene-specifica oltre che nella risposta immunitaria di tipo innato attraverso i suoi effetti sulle cellule NK.

In *vitro*, IL-2 regola il tempo, l'ampiezza e la durata della proliferazione di linfociti T antigene attivati mentre in *vivo* è responsabile dell'espansione clonale di linfociti CD4 + e CD8 + antigene-competenti. Successivamente alla loro espansione, la diverse funzioni esplicate da entrambe le sottopopolazioni di linfociti T helper e dai linfociti citotossici dipende da un adeguato approvvigionamento di IL-2.

Inoltre, il mantenimento dei cloni proliferati è supportato da IL-2; infatti la memoria dei linfociti T in quanto a dimensione, la funzione e il mantenimento del *pool* di linfociti T della memoria è determinato da IL-2.

In aggiunta a queste influenze positive attribuibili all'IL-2, ci sono *feedback* regolatori negativi esercitati dall'IL-2, che agiscono limitando la risposta immunitaria. Queste osservazioni sono supportate da dati derivati da esperimenti in cui si effettuava la soppressione del gene codificante per IL-2 e IL-2R.

IL-2 ha ad oggi una applicazione terapeutica per il potenziamento del sistema immunitario in corso di trattamento neoplastico e delle malattie infettive.

D'altra parte l'azione di farmaci immunosoppressivi comunemente utilizzati sono incentrate sull'inibire la produzione o l'azione dell'IL-2. Ne consegue come IL-2 giochi un ruolo centrale nella manipolazione terapeutica del sistema immunitario.

Struttura genica e proteica

La struttura iniziale segnalata per IL-2 a 4 α eliche antiparallele è stata sostanzialmente corretta dopo il confronto con le strutture di IL-4 e GM-CSF (Bazan, 1992). Tuttavia, è ormai riconosciuto che molte delle molecole designate come interleuchine, così come i fattori di crescita ematopoietica, l'ormone della crescita e la prolattina hanno la stessa struttura di base.

L'unica modifica post trascrizionale dell'IL-2 è la glicosilazione (Robb e Smith, 1981). Sebbene l'esatta natura dei carboidrati componenti debba ancora essere determinata, la glicosilazione determina una variabilità nelle dimensioni della proteina come monitorato mediante SDS-PAGE e da diversa carica rilevata tramite un differente punto isoelettrico.

In realtà, tale variabilità ha portato all'erronea conclusione che l'attività biologica fosse imputabile ad una famiglia di molecole simili, piuttosto che una singola proteina a dimensione variabile e carica variabile conseguente alla glicosilazione.

Le funzioni espletate dai carboidrati sono sconosciute. Tuttavia, come molte proteine secrete, si presume che rivestano una funzione quantomeno nel migliorare la solubilità idrofila visto che l'IL-2 ricombinante derivato da *E. coli* privo di carboidrati è relativamente insolubile in soluzioni acquose.

Ad ogni modo i carboidrati che vanno a completare la proteina sono inutili per l'attività biologica di IL-2. Dettagliati esperimenti con IL-2 ricombinante (rIL-2) comparata all'IL-2 naturale hanno dimostrato coincidenti curve dose-risposta sia per il legame con il recettore IL-2R che per l'effetto nel promuovere la crescita. Pertanto, c'è una significativa porzione della molecola che non contiene carboidrati, consentendo in tal modo ai residui aminoacidici di legarsi al recettore IL-2R.

Poiché non esistono molecole di IL-2 naturale prive di carboidrati, è possibile che l'IL-2 di tipo non glicosilato possa essere riconosciuta come estranea dal sistema immunitario, provocando una risposta immunitaria alla terapia con somministrazione di rIL-2.

Questo sarebbe ancora più probabile se la molecola di rIL-2 contenesse anche delle sostituzioni nella catena di aminoacidi che, fungendo da peptidi modificati, potrebbero essere presentati e riconosciuti dai linfociti T.

Fonti cellulari ed espressione tissutale

I linfociti T sono le uniche cellule capaci esprimere il gene per IL-2, e la sua espressione genica è strettamente controllata dal recettore antigenico dei linfociti T (TCR) (Smith, 1980; Taniguchi *et al.*, 1983; Meuer *et al.*, 1984).

In seguito ad attivazione del TCR, vi è una espressione genica di IL-2 transitoria, con mRNA rilevabile entro i primi 45 minuti dal momento della stimolazione ed un picco registrato a circa 6 ore (Shaw *et al.*, 1988). Nelle seguenti 12 ore l'mRNA codificante per IL-2 è appena rilevabile. La secrezione di IL-2 proteica segue lo stesso andamento con concentrazioni massime rilevabili a circa 12-24 ore (Smith, 1980).

Quando analizzati da citometria a flusso, circa il 60% dei linfociti umani T CD4 + producono IL-2 in seguito a stimolazione policlonale mediante forbolo miristico acetato (PMA) o calcio ionoforo (Ca). In confronto, solo il 30% circa di linfociti T CD8 + mostra una produzione intracellulare rilevabile di IL-2.

Perché di norma i linfociti T CD4 + sono il doppio rispetto al numero di linfociti T CD8 +, la maggior parte della capacità di produzione di IL-2 deriva da linfociti T CD4 +. In gran parte, questa discrepanza spiega il sostegno che i linfociti T CD8 + devono ricevere dai linfociti T CD4 +. Producendo IL 2 infatti, i linfociti T CD4 + rendono possibile anche l'espansione di linfociti T CD8 + antigeni-specifici.

L'attivazione della molecola di costimolazione CD28 migliora notevolmente la produzione di IL-2 (Verweij *et al.*, 1991). La maggior parte delle prove indica che questo effetto è mediato attraverso l'attivazione di NF κ B, che agisce in sinergia con i fattori di trascrizione attivati dal TCR (Verweij *et al.*, 1991; Ghosh *et al.*, 1993).

In aggiunta, CD28 determina anche una stabilizzazione dell'mRNA codificante per IL-2, che prolunga notevolmente la sua emivita (Powell *et al.*, 1998).

Questi effetti del CD28 hanno portato alla sua designazione come '*secondo segnale*' in corso di attivazione di linfociti T, dopo quello fornito dal TCR. Pertanto, se il CD28 contribuisce quale

'secondo segnale', l'IL-2 deve essere considerata quale 'terzo segnale' coinvolta nell'attivazione dei linfociti T (Powell *et al.*, 1999) (fig 2.6).

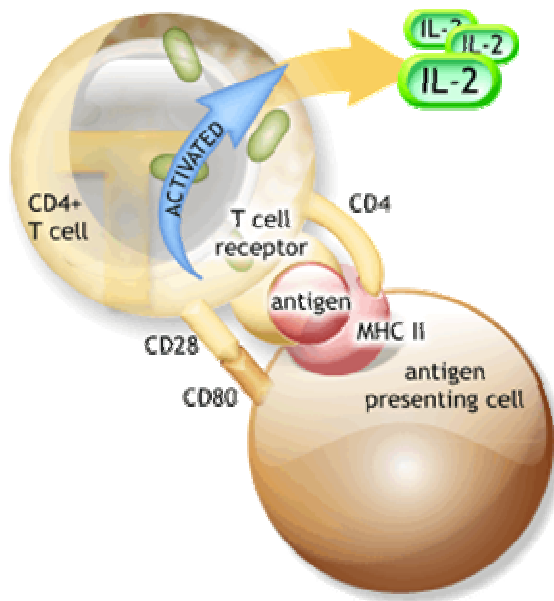


Fig 2.6. Segnali di attivazione di attivazione dei linfociti T che coinvolgono simultaneamente CD 28, recettore dei linfociti T (TCR) e interleuchina 2 (IL 2).

Una importante classe di molecole ad effetto regolatorio negativo verso la produzione di IL 2 è rappresentato dagli ormoni glucocorticoidi prodotti dalla ghiandola surrenale. Tale capacità da parte dei glucocorticoidi di sopprimere la trasformazione di linfociti blastici e la loro proliferazione è conosciuta da molto tempo (Nowell, 1961). Più tardi tale effetto è stato attribuito ad una soppressione della produzione di IL-2 (Smith *et al.*, 1977; Gillis *et al.*, 1979a, b). Più recentemente, è stato dimostrato che gli effetti dei glucocorticoidi possono essere attribuiti ad una inibizione dell'attivazione del fattore di trascrizione NFκB (Auphan *et al.*, 1995; Ray e Prefontaine, 1994).

Dai risultati ottenuti dagli esperimenti pare vi sia un feedback di regolazione tra sistema immunitario e asse ipotalamica-pituitaria-surrenalica (HPA) (Chrousos, 1995). Con l'introduzione di un antigene, l'attivazione di entrambe le difese di tipo innato e acquisito dell'ospite, la produzione di citochine, in particolare della componente proinfiammatoria, quale IL-1, IL-6 e TNF, conducono all'attivazione dell'asse HPA e alla produzione di glucocorticoidi da parte della ghiandola surrenale. Questi ormoni quindi hanno la funzione di attenuare l'attivazione del sistema immunitario antigene-guidata sopprimendo la produzione di IL-2 e di altre citochine proinfiammatorie.

Il recettore per IL-2 (IL-2R) è stato il primo recettore per citochine ad essere scoperto e caratterizzato. Come tale IL-2R è divenuto il prototipo di recettore per citochine ed ormoni in grado di agganciarsi al ligando con alta affinità e specificità e, allo stesso tempo, innescare il segnale di attivazione all'interno della cellula in conseguenza a tale connessione.

I dosaggi biologici più comunemente utilizzati per quantificare l'IL2 sono di seguito elencati: la valutazione della proliferazione su linfociti CTL IL 2 rispondenti, la capacità di generare linfociti CTL; la capacità di generare linfociti Th1 o Th2; l'attivazione dell'attività citolitica e della produzione di citochine in linfociti NK e l'attivazione della produzione anticorpale.

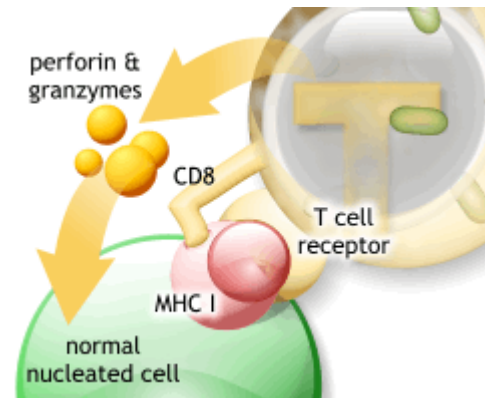
Il dosaggio biologico per l'IL-2 avviene nel seguente modo: diluizioni standard di IL-2 vengono aggiunte a linfociti CTLL IL-2-responsivi. La piastra è incubata per 12 h a 37°C, quindi la percentuale di linfociti che sintetizza DNA è controllata dall'incorporazione di [3H] timidina, o viene quantificato il numero di linfociti vitali mediante colorazione.

Attività *in vitro*

IL-2 endogena è necessaria per la generazione *in vitro* di linfociti citotossici (CTLs) e, quando fornita in maniera esogena, IL-2 potenzia l'entità dell'attività citolitica generata (Baker *et al.*, 1978). Il contributo nella proliferazione di linfociti antigene-competenti rispetto ad un effetto di differenziazione dell'IL-2 esercitato sull'attività citolitica rimane ancora oscuro, anche se è chiaro che IL-2 facilita anche la differenziazione dei CTLs.

IL-2 determina l'attivazione della trascrizione dei geni coinvolti nella citolisi (**Fig 2.7**) come la perforina (Liu *et al.*, 1992), oltre a stimolare l'espressione del ligando Fas, che è necessario per l'apoptosi (Fournel *et al.*, 1996; Refaeli *et al.*, 1998).

Fig 2.7
Attivazione di meccanismi coinvolti nella citolisi da parte dell'IL 2.



IL-2 è anche necessario per una ottimale generazione di entrambe le sottopopolazioni di linfociti Th1 e Th2 (Swain, 1994, 1999).

Così, i linfociti Th1 saranno predominanti in presenza di IL-12 e IFN γ ma IL-2 ne aumenta il processo di differenziazione. Allo stesso modo, l'aggiunta di IL-2 a linfociti T helper (Th) in presenza di IL-4 porta alla generazione della sottopopolazione linfocitaria Th2, che è in grado di produrre a sua volta elevati quantitativi di IL-4.

Anche in questo caso, vi è senza dubbio una componente proliferativa nel processo di generazione e di differenziazione ottimale verso linfociti Th1 e Th2, in cui l'IL-2 è il principale fattore di crescita per i linfociti T (Rogers *et al.*, 1998).

L'effetto esercitato dall'IL-2 sui linfociti B è stato dibattuto per molti anni.

In contrasto con i linfociti T, l'IL-2 non gioca un ruolo importante come fattore di crescita per i linfociti B. Tuttavia, studi approfonditi hanno dimostrato che l'IL-2 è coinvolta nell'attivazione trascrizionale della catena J, e promuove lo *splicing* dell'RNA necessario per il passaggio da IgM di membrana a secretorie (Tigges *et al.*, 1989; Kang *et al.*, 1998). Pertanto, IL-2 è indispensabile per la primaria risposta immunoglobulinica IgM mediata agli antigeni.

IL-2 svolge un ruolo chiave nello stimolare i linfociti NK. Tali cellule differiscono dai linfociti T nell'espressione di recettori per IL-2 poiché non necessitano di alcun segnale di attivazione (Smith, 1989). Da premettere che solo il 10% dei linfociti NK circolanti esprimono recettori eterotrimerici IL-2R ad alta affinità mentre la restante quota esprime IL-2R eterodimerici ad affinità intermedia (Caligiuri *et al.*, 1990). L'aggiunta di IL-2 *in vitro* a linfociti NK aumenta

molte delle funzioni attribuite ad essi, compresa la loro proliferazione, la capacità citolitica e la capacità produttiva di citochine. I linfociti NK quando stimolati da IL-2 esprimono un limitato repertorio di citochine comprendente IFN γ , TNF β e GM-CSF.

Poiché solo i linfociti T antigene-attivati sono in grado di produrre IL-2, l'effetto su linfociti NK e sulla risposta immunitaria di tipo innato dell'ospite entra in gioco solo in un secondo momento, in seguito all'attivazione di linfociti T helper e linfociti citotossici (CTLs) mediata da loro specifici antigeni.

Pertanto, le citochine prodotte da linfociti T, in particolare IL-2 e IFN γ , note per essere potenti stimoli per i linfociti NK, mettono in relazione sistema immunitario innato e acquisito dell'ospite una volta che i linfociti antigene-specifici si sono moltiplicati e differenziati.

È importante sottolineare che i linfociti sono le uniche cellule in grado di rispondere all'IL-2.

In particolare, le cellule dell'endotelio vascolare non esprimono valori rilevabili di recettori di tipo IL-2R, né sono in grado di rispondere in vitro a concentrazioni fisiologiche di IL-2.

Pertanto, molti dei ben noti effetti dell'IL-2, relativi alla circolazione di leucociti e la loro tras migrazione fra le cellule endoteliali dei capillari sono stato ricondotti agli effetti di altre citochine, in particolare chemochine e TNF piuttosto che all'IL-2.

Attività *in vivo*

In *vivo*, l'IL-2 è necessaria per la proliferazione di linfociti T antigene-attivati, sia linfociti CD4 + Th1 e Th2 sia CD8 + CTLs, e per l'espansione periferica di linfociti NK. Inoltre, IL-2 è necessaria per la differenziazione di tutte queste tipologie cellulari in cellule effettrici.

Di conseguenza, IL-2 determina la dimensione di una risposta immunitaria cellulare primaria, oltre a determinare l'entità del *pool* di cellule della memoria che sopravvivere dopo che la realizzazione di una prima risposta immunitaria. Queste conclusioni si basano principalmente su esperimenti effettuati con topi *knockout* per il gene IL-2. A questo proposito, è importante notare che questi esperimenti hanno fornito la prima prova che IL-2 non è ridondante ragion per cui nessuna citochina o ligando di superficie può sostituire il ruolo svolto da essa.

La maggior parte dei dati riguardanti il significato biologico e immunologico dell'IL-2 deriva da studi su topi *knockout* (KO) per IL-2.

La soppressione del gene IL-2 non ha alcun effetto sullo sviluppo dei linfociti, tanto che alla nascita tali animali presentano normali numeri di linfociti T, B e cellule NK nei compartimenti linfoidi primari e secondari. Tuttavia, una progressiva iperplasia linfoide si verifica durante lo sviluppo post natale, e linfociti si vanno ad accumulare nei tessuti linfoidi secondari con una superficie fenotipica attivata (Schorle *et al.*, 1991). In concomitanza, una anemia emolitica autoimmune prende piede, e la maggior parte dei topi iniziano a morire a causa di anemia entro le prime settimane di vita. I topi sopravvissuti oltre questa fase iniziale sviluppano successivamente una enterite a carico del colon (Sadlack *et al.*, 1993, 1995). Tuttavia, se conservato in un ambiente privo di agenti patogeni, l'enterite non si sviluppa. Pertanto, l'attivazione antigenica sembra contribuire alla patologia.

Si è evidenziato come topi KO per CTLA-4 sviluppino un'identica sindrome a topi KO per IL-2 (Waterhouse *et al.*, 1996). CTLA-4 modula i segnali di inibizione che sopprimono l'attivazione dei linfociti e, dal momento che l'espressione di CTLA-4 è IL-2-dipendente, sembra che la mancanza di entrambi determini un'assenza nella normale *downregulation* in corso di risposta immunitaria.

Basandosi sull'attività dell'IL-2 *in vitro*, ci si potrebbe attendere che in topi KO per IL-2 si assista ad una sindrome da immunodeficienza piuttosto che una sindrome linfo-proliferativa.

In realtà, quando per la prima volta si è andati a testare un modello di topi KO per IL-2 in corso di malattia infettiva si è segnalata la presenza di risposte immunitarie IL-2-mediate di grado

ancora rilevabili anche se diminuite rispetto ai topi *wild-type* (Kundig *et al.*, 1993). Ciò ha portato all'erronea conclusione che esistono citochine ridondanti responsabili dell'espansione clonale dei linfociti T *in vivo*.

Tuttavia, successivamente è stato accertato che vi è una forte attenuazione della espansione di linfociti T CD8 + antigene-attivati in topi IL-2 KO (Cousens *et al.*, 1995). Pertanto, questi esperimenti non hanno che confermato il ruolo dell'IL-2 quale principale fattore di crescita per i linfociti T CD8 +, sia *in vitro* che *in vivo*.

La costruzione di topi transgenici per IL-2 nei quali si era indotta una *over expression* di IL-2 umana in tutti i tessuti non si traduceva in un distintivo fenotipo (Ishida *et al.*, 1989). In tali topi sono state descritte infiltrazioni di cellule dendritiche nella pelle e di cellule infiammatorie nel cervelletto (Katsuki *et al.*, 1989). L'elemento più importante è che la *over expression* cronica di IL-2 non è coinvolta nello sviluppo di leucemie, linfomi o nell'insorgenza di malattie autoimmuni.

In vitro, il tempo, grandezza, e la durata della proliferazione dei linfociti T antigene-attivati dopo stimolazione è determinato dalla disponibilità di IL-2 (Cantrell e Smith, 1984). Così, se fornita per via esogena, IL-2 continuerà a promuovere l'espansione clonale di linfociti antigene-reattivi e, nel contempo, annullerà l'apoptosi derivante dal consumo determinato dalla stessa proliferazione dei linfociti.

In vivo, dopo la massiccia proliferazione che si traduce in un aumento del numero di linfociti antigene-reattivi, vi è una perdita del 90% di queste linfociti proliferati (Gallimore *et al.*, 1998; Murali Krishna *et al.*, 1998). Proprio come la somministrazione di IL-2 *in vitro* elude l'apoptosi, l'IL-2 *in vivo* dopo somministrazione di antigene previene la perdita dei linfociti antigene-reattivi che sono andati incontro ad espansione clonale (Kuroda *et al.*, 1996). Di conseguenza, questi risultati sono importanti quando si considera l'uso di IL-2 come un immuno-terapeutico o come coadiuvante per i vaccini.

IL-2 aumenta la produzione di quasi tutte le altre citochine attualmente individuate o direttamente, tramite la trascrizione di attivazione dei vari geni di citochine o indirettamente, attraverso l'attivazione di citochine secondarie. L'entità di tali effetti è strettamente dipendente dalla concentrazione IL-2, oltre a dipendere dal numero di linfociti esprimenti il recettore (IL-2R+) presenti. Inoltre, la proporzione relativa di linfociti T antigene-attivati e linfociti NK determina il risultato finale della liberazione endogena o della somministrazione esogena di IL-2.

IL-2 è il principale responsabile fra i fattori di crescita per l'espansione di linfociti T CD8 + maturi periferici antigene-attivati. Per esempio, in seguito a infezione sistemica con il virus Epstein-Barr (EBV), si assiste ad una forte espansione di linfociti T CD8 +antigene-specifici che determina l'eliminazione di linfociti B infetti da EBV (Callan *et al.*, 1996). Questa espansione è subordinata all'aiuto da parte di linfociti T CD4 +, una conclusione suggerita da esperimenti in cui cloni di linfociti CTL sono stati amplificati *in vitro* e poi ri-inoculati. Senza l'inoculazione di cloni di linfociti T CD4 + antigene-specifici , i cloni dei linfociti T CD8 + andavano rapidamente incontro ad apoptosi. Anche se deve ancora essere dimostrato definitivamente, alla luce dei dati finora disponibili pare che l'aiuto derivante da linfociti T CD4 + stia proprio nell'IL-2. Questa stessa IL-2 promuove la proliferazione e la differenziazione dei linfociti Th1 e Th2, così come la proliferazione e la differenziazione dei linfociti NK.

L'AIDS rappresenta il prototipo di malattia che si manifesta in conseguenza ad un deficit di linfociti T helper; si assiste infatti sia in termini qualitativi che quantitativi ad un calo dei linfociti CD4 +. Così, oltre ad un calo della concentrazione di linfociti T CD4 + circolanti,

viene ad essere compromessa anche la loro capacità funzionale per la produzione di citochine, in particolare per IL-2.

In esperimenti per determinare la capacità dei linfociti T nella produzione di citochine *in vitro*, dopo una stimolazione policlonale, si è riscontrato un deficit selettivo nella produzione di IL-2 da entrambe le sottopopolazioni di linfociti T CD4 + e CD8 + T derivanti da soggetti HIV + rispetto a soggetti sani.

Il risultato finale di questo deficit nella produzione di citochine si traduce in una persistenza del virus HIV, e, in ultima analisi, nella suscettibilità alle infezioni opportuniste.

Il deficit di produzione di IL-2 da parte di linfociti provenienti da individui HIV + può ben motivare la paradossale ipergammaglobulinemia spesso evidenziata. Pertanto, anche il normale feedback negativo IL-2-mediata del sistema immunitario è compromesso. In concomitanza, l'incapacità di promuovere l'espansione CD8 + CTLs antigene-selezionati per mancanza di IL-2 crea una situazione che ricalca una cosiddetta situazione di fenotipo TH2, dove la risposta immunitaria umorale predomina sulla risposta immunitaria cellulare (Clerici *et al.*, 1993).

Terapia

La farmacodinamica di IL-2 è basata sul tipo e sulla distribuzione dei recettori per IL-2 (Smith, 1993). Recettori per IL-2 ad alta affinità, composti da catene eterotrimeriche sono espressi solo transitoriamente su linfociti T antigene-attivati e linfociti B, e su circa un 10% dei linfociti NK. Poiché l'affinità dei recettori eterotrimerici è molto alta sono sufficienti concentrazioni molto basse di IL-2 (<100 pM) per saturare questi recettori.

In confronto, l'affinità intermedia di recettori IL-2R, espressi dalla maggior parte dei linfociti NK, necessitano di concentrazioni 100 volte superiori di IL-2 (circa 10 nM) per la saturazione. Questa differenza di affinità, combinata con la differenza nel numero di linfociti T antigene-attivati e linfociti B rispetto al numero di linfociti NK circolanti, rappresentano le principale differenze tra gli effetti di elevate dosi rispetto a basse dosi di IL-2.

A dosi elevate, si raggiungono concentrazioni sufficienti di IL-2 tali da impegnare ed attivare la maggior parte delle linfociti NK. Di conseguenza, le citochine pro-infiammatorie prodotte da linfociti NK determinano una situazione di grave tossicità sistemica.

Al contrario, se le dosi di IL-2 sono più basse, solo IL-2R ad alta affinità sono saturi, e di conseguenza, un numero inferiore di linfociti sono attivati. Pertanto, la tossicità sistemica può essere notevolmente attenuata o evitata del tutto.

Dal momento che IL-2 è una piccola glicoproteina globulare (15 kDa), essa passa liberamente tra le cellule dei capillari endoteliali, in modo che dopo somministrazione endovenosa vi è una distribuzione omogenea in tutto lo spazio extracellulare. Questa fase di decadimento a causa della distribuzione si verifica in pochi minuti. Se a questo si associa un decadimento imputabile all'escrezione renale avremo che nel giro di circa 16 ore la maggior parte di IL 2 somministrata sarà stata eliminata.

Il metabolismo epatico non sembra giocare un ruolo nella farmacocinetica dell'IL-2, almeno per quanto riguarda la forma ricombinante rIL-2 non glicosilata. Anche il legame e l'internalizzazione di IL-2 da parte dei recettori per l'IL-2 sui linfociti bersaglio non assumono alcun effetto significativo nella distribuzione e rimozione di IL-2.

La farmacocinetica di entrambe le terapie ad alto e basso dosaggio di IL-2 sono simili, poichè i livelli di *clearance* renale vengono superati e non vi è un aumento progressivo delle concentrazioni plasmatiche di IL-2 nel corso del trattamento. Questo determina un progressivo grado di infiammazione sistemica all'aumentare dell'intervallo di trattamento all'aumentare delle dosi.

Dopo una iniezione sottocutanea di IL-2, vi è una relativamente rapida comparsa di IL-2 nel plasma. L'assorbimento è ipotizzato verificarsi attraverso i linfatici, basandosi su studi condotti con altre citochine con simile dimensione e struttura.

Successivamente, in seguito a diffusione endovenosa e distribuzione nel compartimento extravascolare associati a clearance renale si assiste ad un decadimento della concentrazione di tale proteina. Di conseguenza, l'iniezione ogni 12-24 ore determina concentrazioni plasmatiche costanti di IL-2, che variano a seconda della dose di IL-2.

Tipicamente dopo l'iniezione sottocutanea di IL-2, vi è un classica ipersensibilità di tipo ritardato (DTH), reazione che si sviluppa entro 24 ore nel sito di iniezione. La dimensione della risposta infiammatoria è IL-2 dose-dipendente, come lo è la sua durata. Questa reazione DTH richiede pertanto un cambio della sede di iniezione a rotazione, dal tronco passando alle braccia e infine alle gambe.

IL-2 è stata la prima interleuchina ad essere utilizzata in ambito clinico. Lanciato da Steven Rosenberg nel tentativo di aumentare la reattività immunitaria in pazienti affetti da cancro, i principi di intensificazione della dose sono stati utilizzati per stabilire la dose e i parametri di IL-2 da utilizzarsi, fino a valori di tossicità derivanti da chemioterapia citotossica (Rosenberg *et al.*, 1987). Pertanto, la dose di IL-2 è stata istituita in base a protocolli stabiliti empiricamente, senza considerare la sua farmacodinamica. IL-2 è stato somministrato in dosi molto elevate per via endovenosa, e bolo iniezioni ogni 8 ore. Questo tipo di regime di trattamento ha determinato una grave tossicità sistemica, con segni clinici, che successivamente hanno preso il nome di 'sindrome da citochine' (Lotze *et al.*, 1985)

Il risultato finale è la stimolazione di un massiccio rilascio secondario di citochine proinfiammatorie, IFN, TNF e GM-CSF, che determinano la cosiddetta 'fuga capillare' caratteristica della sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS).

Elevate dosi di IL-2 sono state impiegate in corso di terapia antitumorale in individui affetti da carcinoma renale (Rosenberg *et al.*, 1987) rilevando come sia necessario raggiungere una grave tossicità per ottenere una risposta antitumorale. Tuttavia, i meccanismi responsabili di questa risposta antitumorale rimangono oscure anche dopo anni di terapia con IL-2.

L'IL-2 è stata utilizzata nel trattamento delle persone affette da HIV. Sono state provati due diversi regimi di dosaggio: il primo costituito dal trattamento ad alte dosi di tipo intermittente (Kovacs *et al.*, 1996) mentre il secondo a basse dosi a regime continuo (Jacobson *et al.*, 1996).

La terapia effettuata con alti dosaggi somministrati in maniera trasmittente risulta in una marcata leucopenia di tutte le cellule bianche del sangue durante l'intervallo di trattamento. Successivamente, dopo l'interruzione del trattamento, vi è una ripresa della concentrazione di leucociti circolanti, in modo tale che i loro livelli rapidamente riprendono superando di oltre 10 volte i loro valori di pretrattamento.

Successivamente, nei 2 mesi seguenti il termine della terapia, la concentrazione di linfociti T CD4 +, CD8 + cellule NK, linfociti B, monociti tornano gradualmente verso i loro valori basali. Pertanto, nel corso di un anno mediante combinazione di chemioterapia antivirale e immunoterapia con IL-2, la concentrazione di linfociti circolanti può essere normalizzata nella maggior parte degli individui, in modo che il rischio di infezioni opportunistiche sia minimizzato.

In contemporanea con l'aumento dei linfociti T CD4 +, vi è un rapido aumento del numero di linfociti NK i quali rimangono elevati fino a quando la terapia di IL-2 viene mantenuta.

Al contrario, in assenza di stimolazione antigenica virale, elevate concentrazioni di linfociti CD8 + circolanti T diminuiscono gradualmente nonostante la somministrazione giornaliera di IL-2.

Poiché la dimensione della popolazione di cloni antigene-dipendenti selezionati determina la grandezza della popolazione di cellule della memoria, e che la somministrazione di IL-2, in particolare durante la fase terminale di risposta immunitaria all'antigene, impedisce l'apoptosi dei cloni proliferati, ne consegue che la terapia con IL-2 servirà come efficace coadiuvante nei protocolli vaccinali.

Tale approccio dovrebbe aumentare l'efficacia dei vaccini in cui dosi ripetute sarebbero inutili. Inoltre, un simile approccio può rivelarsi utile quando vengono somministrati i vaccini a scopo terapeutico, per esempio in corso di infezione da HIV. Poiché l'IL-2 aumenta sia il numero che la funzione dei linfociti antigene-stimolati, IL-2 è un logico adiuvante nell'immunoterapia per il trattamento delle infezioni latenti, per aumentare l'immunità microbica in modo che la latenza venga mantenuta; anche nell'infezione da HIV può in definitiva essere contenuta con un tale approccio. Inoltre infezioni da *virus dell'epatite C* (HCV) e da *citomegalovirus* (CMV), possono anche beneficiare di una terapia combinata vaccino/IL-2.

Il meccanismo d'azione dei farmaci immunosoppressivi più comunemente utilizzati si concentra sul prevenire la produzione o l'azione di IL-2. Come già descritto, i glucocorticoidi svolgono un'azione immunosoppressiva perché impediscono la proliferazione dei linfociti T (Nowell, 1961), bloccando la produzione di IL-2 (Gillis *et al.*, 1979a, b), attraverso l'inattivazione degli specifici fattori di trascrizione necessari per IL-2 espressione genica (Yang-Yen *et al.*, 1990; Auphan *et al.*, 1995; Ray *et Prefontaine*, 1994).

In modo simile anche il farmaco immunosoppressivo ciclosporina A (CSA) inibisce la proliferazione TCR-attivato, impedendo la produzione di IL-2.

Tuttavia, il meccanismo d'azione, simile a quello degli ormoni glucocorticoidi (GCHs), comporta l'inattivazione di NF-AT piuttosto che l'NF κ B (McCaffery *et al.*, 1993; Northrop *et al.*, 1994). CSA impedisce l'attivazione della calcineurina fosfatasi, che è richiesta per la defosforilazione di NF-AT, consentendo in tal modo la traslocazione nucleare e l'attivazione trascrizionale del gene per IL-2.

La rapamicina impedisce l'azione IL-2 piuttosto che la sua produzione (Powell *et al.*, 1999). Il meccanismo prevede la mancata degradazione dell'inibitore chinasi ciclina-dipendente p27 (CKI), che è richiesto per la progressione del ciclo cellulare in fase G1 promosso attraverso l'IL-2. La combinazione di GCHs, CSA e rapamicina è molto efficace e immunosoppressiva, in quanto tutti mirano a prevenire la produzione o l'azione di IL-2, agendo però con diversi meccanismi.

L'uso dell'anticorpo monoclonale Tac per impedire il legame fra IL-2 e recettore ad alta affinità è stato dimostrato essere un'efficace terapia immunosoppressiva per la prevenzione del rigetto allogenico (Vincenti *et al.*, 1998; Waldmann e O'Shea, 1998).

Di conseguenza, tutti questi approcci sottolineano il ruolo centrale dell'IL-2 nel generare una risposta immunitaria efficace e l'utilizzo di terapie immunosoppressive in grado di bloccare la produzione o l'azione di IL 2.

2.12 Interleuchina 4 (IL 4)

Introduzione

IL-4 è una citochina prodotta da linfociti T attivati, mastociti e basofili. Essa suscita molte reazioni biologiche, due delle quali spiccano per essere di grande importanza: la regolamentazione della differenziazione delle cellule T helper verso il tipo TH2 e la regolamentazione della produzione di IgE e IgG1 da parte dei linfociti B.

Nel corso degli ultimi anni, numerosi studi utilizzando il *gene targeting* e approcci transgenici hanno esaminato il ruolo *in vivo* dell'IL-4 in modelli di malattia.

Come risultato di questi studi, sono stati testati nuovi approcci mirati ad inibire o potenziare gli effetti dell'IL-4 in modelli di malattia negli animali e in pazienti umani.

Strategie messe a punto per bloccare l'IL-4 hanno mostrato costituire una buona promessa nel prevenire o migliorare alcune malattie allergiche.

Studi per modulare la produzione di IL-4 in vari tessuti sono in fase di sperimentazione soprattutto in oncologia e riguardo la capacità di indirizzare una patologica risposta TH1 verso una non dannosa risposta Th2. Queste strategie potrebbero in definitiva portare alla possibilità di gestire i potenti effetti dell'IL-4 per il miglioramento della salute umana ed animale.

Struttura genica e proteica

Il gene codificante per IL-4 nel topo si colloca sul cromosoma all'interno di un complesso che contiene geni anche per altre citochine (Frazer *et al.*, 1997)

Il gene per l'IL-4 è strettamente legato al gene per l'IL-13, che si trova immediatamente a valle. Anche il gene per un'altra citochina tipica della sottopopolazione Th2, l'IL-5, è strettamente collegato.

Il fattore di regolamentazione dell'interferone 1 (IRF-1) si trova a 200 kb telomerici dall'IL-4. I geni codificanti per IL-3 e GM-CSF si trovano pure in questa regione cromosomica. La vicinanza delle citochine IL-4, IL-13 e IL-5 suggeriscono che vi può essere qualche tipo di controllo per consentire a tale locus di coordinare le espressioni di queste citochine TH2 all'interno delle cellule.

Il gene IL-4 si compone di quattro esoni e tre introni. In mastociti in grado di esprimere IL-4, ma non in linfociti T, vi è un'unica ipersensibilità alla DNase I nel secondo introne, suggerendo la possibilità di una specifica regolamentazione nella produzione di IL-4 a seconda della tipologia di cellula considerata (Brown *et Hural*, 1997).

Un gran numero di ricercatori ha studiato la regolazione della trascrizione del gene IL-4 in linfociti T (Szabo *et al.*, 1997). Si è notato ad esempio che la regione 5' non codificante del gene IL-4 contiene numerosi elementi in grado di interagire regolando la trascrizione dell'IL-4.

Il promotore di produzione per IL-4 contiene un sito chiamato "MARE", che interagisce con il fattore di trascrizione c-maf, espresso in linfociti TH2 ma non in linfociti TH1, linfociti B o monociti.

L'espressione di c-maf è indotta in linfociti T primari (Th0) durante la differenziazione dei linfociti TH2. Il c-maf fattore di trascrizione può essere parte di un gruppo di fattori che determinano l'espressione tessuto-specifica di IL-4.

Molti potenziali siti di legame per il fattore di trascrizione GATA-3 sono disseminati in tutto il locus dell'IL-4, compreso il promotore di IL-4 (Ranganath *et al.*, 1998).

L'espressione di GATA-3 è soppressa in linfociti TH1 e rafforzata in linfociti TH2.

Linfociti T derivati da topi transgenici per GATA-3 esprimono non solo citochine di tipo Th1, ma anche citochine di tipo Th2 quali IL-4, IL-6 e IL-10.

Questi risultati suggeriscono che GATA-3 può agire come regolatore nella produzione di citochine Th2.

Poichè la stessa IL-4 regola la differenziazione verso i linfociti TH2, i fattori di trascrizione IL-4-attivati sono candidati per regolare la trascrizione di IL-4 stessa.

Il promotore dell'IL-4 contiene due siti per l'interazione di tali fattori, STAT6 e HMGI (Y).

Il loro preciso ruolo nella regolazione del gene IL-4 endogeno non è ancora chiaro, tuttavia, i recenti risultati indicano che l'espressione di c-maf e GATA-3 nello sviluppo di linfociti T helper dipende da STAT6.

Studi effettuati da diversi gruppi di ricerca indicano che IL-4 può anche modificare la struttura della cromatina in linfociti T (Agarwal *et al.*, 1998; Bix *et al.*, 1998; Riviere *et al.*, 1998); tale rimodellamento determinato da ipersensibilità alla DNase I e perdita dei siti di metilazione richiede lo STAT6, ma è indipendente di c-maf.

Il disegno che ne emerge prevede che STAT6 IL-4-attivato migliori l'espressione di GATA-3 e induca l'espressione di c-maf. GATA-3 avrebbe quindi un ruolo nel rimodellamento della cromatina nel locus dell'IL-4, mentre c-maf potrebbe direttamente regolare il promotore dell'IL-4.

IL-4 è una glicoproteina globulare del peso di 20 kDa. Il suo core polipeptidico ha un peso che raggiunge i 14 kDa mentre i rimanenti 6 kDa sono composti da 3 motivi di carboidrati legati al terminale proteico N.

IL-4 svolge le sue funzioni in forma monomerica. La struttura di IL-4 è stata descritta da Powers *et al.*, (1992) e da Wlodawer *et al.*, (1992).

IL-4 assume una struttura globulare composta da quattro brevi strutture elicoidali (denominate A, B, C, D) che sono disposte in configurazione *up-up-down-down*.

Residui aminoacidici fra gli AA 6-19 compongono l'elica A con 27-30 residui che compongono la sezione e il collegamento fra le strutture a pieghe. Gli aminoacidi 41-59 compongono l'elica B. I residui 70-94 formano l'elica C con residui 106-109 looping che compongono la sezione e foglio. Residui 110-127 compongono elica D. Inoltre all'interno della struttura sono presenti tre coppie di ponti disolfuri intracatenari.

IL-4 prende contatto con il suo recettore IL-4R mediante i residui appartenenti alle eliche A e C, mentre i residui nell'elica D (soprattutto Tyr124 e Ser121), prendono contatto con le subunità recettore associate (Kruse *et al.*, 1993).

Le mutazioni di questi residui nell'elica D generano antagonisti IL-4 poiché tali prodotti sono sì ancora in grado di impegnare il recettore IL-4R, ma non sono in grado di determinare eterodimerizzazione con conseguente attivazione del recettore.

IL-4 possiede delle omologie strutturali con altri membri delle citochine a corta elica che comprendono IL-2 and IL-13.

Il 4 ha una omologia al 30 % con IL-13, una citochina che ha simili funzioni biologiche e modalità di utilizzazione del recettore.

IL-4 è sintetizzata come proteina precursore del peso di 14 kDa nel reticolo endoplasmatico rugoso. Circa tre oligosaccaridi collegati al terminale N sono aggiunti e trasformati nell'apparato del Golgi, con un risultante peso molecolare finale di 20 kDa. I residui di carboidrati probabilmente non sono importanti in funzione di IL-4, visto che IL-4 ricombinanti

ottenute in una varietà di sistemi tra cui E. coli, lieviti e cellule di insetti prive di oligosaccaridi si mostravano comunque tutte biologicamente attive.

Fonti cellulari ed espressione tissutale

L'espressione genica di IL-4 è altamente specifica in ogni tessuto. La sua espressione è indotta in linfociti differenziati nel sottotipo T helper 2 (Th2) e cellule T NK in risposta alla stimolazione attraverso il recettore di superficie dei linfociti T (TCR) (Paul, 1991). IL-4 è anche liberata da mastociti, basofili ed eosinofili in risposta alla stimolazione attraverso recettore per le IgE sulla superficie cellulare (Woerly *et al.*, 1999).

L'agente farmacologico PMA associato ad un Ca^{2+} ionoforo può anch'esso stimolare la produzione di IL-4 in queste cellule mentre la produzione di IL-4 in risposta a questi stimoli può essere bloccata dall'immunosoppressore ciclosporina A.

IL-4 lega due tipi di recettori cellulari definiti recettori cellulari di tipo I e tipo II. A seconda delle cellule considerate si ha espressione di uno o dell'altro recettore in accordo con l'abilità dell'IL-4 nell'esplicare i suoi effetti su un notevole numero di cellule.

Attività *in vitro*

Sono descritte numerose attività biologiche in letteratura attribuibili all'IL-4 su un gruppo eterogeneo di tipi di cellule in test *in vitro*. IL-4 ha effetti su linfociti B, linfociti T, macrofagi, mastociti, fibroblasti, cellule epiteliali e cellule endoteliali. Essa ha inoltre effetti su un certo numero di diverse linee cellulari tumorali tra cui l'inibizione della crescita di cellule di carcinoma renali.

IL-4 agisce come un fattore per la vitalità di linfociti B e linfociti T e come costimolante per la loro proliferazione. Essa spinge la differenziazione delle cellule T verso il fenotipo TH2 e disciplina l'espressione genica dei linfociti.

IL-4 inoltre induce l'espressione di CD23 e B7 sui linfociti B ed aumenta espressione di MHC di classe II. In presenza di molecole costimolatrici, IL-4 causa uno *switch* isotipico della risposta anticorpale determinando la produzione di anticorpi IgG1 e IgE.

IL-4 esercita un certo numero di effetti sui monociti; aumenta l'espressione di molecole MHC di classe II e IL-1Ra mentre *down regola* la produzione di citochine proinfiammatorie quali IL-1, TNF, IL-6 e IL-8.

IL-4 è un fattore di crescita e di sopravvivenza per i mastociti.

Esso esalta espressione di VCAM-1 sulle cellule endoteliali e *down regola* la produzione di IL-8. IL-4 induce la produzione di eotassina da parte di cellule epiteliali polmonari e la secrezione di ioni Cl^- in cellule epiteliali dell'intestino. Anche se questo è un elenco ridotto delle attività esercitate dall'IL-4, rende già l'idea del fatto che IL-4 può causare un numero di risposte in molti diversi tipi di cellule.

Per molte delle risposte biologiche a carico dei linfociti B, l'IFN γ è in grado di antagonizzare gli effetti esercitati dall'IL-4.

Questa inibizione potrebbe essere dovuta all'induzione di un gene definito da parte dell'IFN γ che blocca l'attivazione della STAT6 operata dall'IL-4

Per molte delle attività esercitate dall'IL-4 sulle cellule endoteliali, TNF sembra aumentare l'effetto dell'IL-4.

La costimolazione della proliferazione di cellule B purificate trattate con farmaci anti-IgM è stato il primo test biologico per l'IL-4. Anche la capacità di indurre espressione di CD23 sulle cellule B è stato usato come test molto sensibile.

Poiché IL-4 è specie specifico, cellule CT.4s murine transfettate con il cDNA codificante per recettore dell'IL-4 umana sono stati utilizzate in dosaggi per IL-4 umana.

A causa di una completa mancanza di specificità, altri test di routine sono ora utilizzati per misurare i livelli di IL-4, tra cui ELISA ed ELISPOT.

Attività *in vivo*

Mentre *in vitro* IL 4 ha dimostrato possedere un vasto numero di funzioni, il suo normale ruolo *in vivo* sembra essere quello di regolare l'omeostasi di linfociti B, la differenziazione dei linfociti T helper e di regolare lo *switch* isotipico delle immunoglobuline.

Nei topi IL-4 determina uno *switch* di produzione verso anticorpi di tipo IgG1 e IgE, mentre nell'uomo verso le sottoclassi di IgG di tipo 4 (IgG4).

Topi *knockout* per IL-4 si sono mostrati sani ed evidenziano un normale sviluppo dei linfociti. Tuttavia, in termini generali, essi sono deficienti riguardo la risposta Th2 (Muller *et al.*, 1994; Kopf *et al.*, 1995).

Essi sono in grado di organizzare una risposta anticorpale primaria e secondaria. Tuttavia, essi non hanno la capacità di realizzare una forte risposta Th2 alle proteine antigeniche e mostrano una notevole riduzione delle risposte IgG1 e IgE mediate.

I topi privi di IL-4 sono resistenti alle infezioni con alcuni ceppi di *Leishmania Major* (Reiner *et Locksley*, 1995), ma non agli altri. Topi IL-4 KO mostrano anche un deficit nell'espulsione di parassiti intestinali (Finkelman *et al.*, 1997).

In generale, questi risultati sono simili agli effetti del trattamento di topi normali con anticorpi anti-IL-4. Ci sono alcune prove *in vivo*, però che sembrano supportare altre teorie. Per esempio, l'infezione di topi IL-4-knockout con il virus che provoca la sindrome da immunodeficienza acquisita murina, (MAIDS) induce un'imponente risposta IgE mediata (Morawetz *et al.*, 1996).

Topi transgenici per IL-4 in linfociti T hanno dimostrato di avere un'iper-reattività delle vie aeree, congiuntivite allergica all'occhio e lieve iperplasia delle cellule B (Tepper, 1994). Topi transgenici utilizzando un promotore per guidare la trascrizione hanno mostrato osteoporosi (Lewis *et al.*, 1993). Topi transgenici con IL-4 mirata al polmone mostrano una maggiore produzione di muco da parte di cellule mucipare (Temann *et al.*, 1997). Questi fenotipi possono essere correlati con gli effetti *in vitro* su specifici tipi di cellule. Il fattore determinante per il fenotipo *in vivo*, può essere la sede e il livello di espressione del transgene IL-4.

In cellule murine vi è una naturale versione solubile di recettore per IL 4 (IL-4R); in tali modelli il recettore solubile estende l'emivita sierica di IL-4, agendo come un vettore proteico (Ma *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1999)).

Studi di farmacocinetica hanno dimostrato che IL-4 è rapidamente eliminato dal circolo e secreta dai reni in forma degradata.

La clearance di IL-4 è dipendente dal suo recettore e dall'internalizzazione del complesso recettoriale. Il recettore solubile può estendere l'emivita di siero di IL-4, bloccando il legame di IL-4 con il suo recettore sulla superficie cellulare.

Le informazioni sui livelli sierici di IL-4 sono limitate. La capacità di misurare livelli di IL-4 siero è piuttosto difficoltosa e non è ancora stato stabilito un diretto rapporto di causa-effetto tra livelli sierici di IL-4 e patologia (Ng *et al.*, 1999; Rigano *et al.*, 1999).

Inoltre alcuni polimorfismi nel gene IL-4 sono stati collegati ad atopia e asma nei pazienti umani (Marsh *et al.*, 1994). Diversi studi hanno mostrato che polimorfismi nel promoter IL-4 (Song *et al.*, 1996; Rosenwasser, 1999) sono associati a forme allergiche. Ciò induce a ritenere che un'elevata trascrizione di IL-4 può contribuire al fenotipo allergico.

Terapia

IL-4 è stato utilizzato *in vivo* per il trattamento di numerosi modelli di malattia nei topi. Tale citochina si è dimostrata essere la più efficace nel migliorare le malattie autoimmuni causate da linfociti TH1 attivati.

Il trattamento con IL-4 ha dimostrato prevenire lo sviluppo di diabete nei topi NOD (Rabinovitch *et al.*, 1995), modello per il diabete giovanile.

IL-4 si è stato dimostrato capace di impedire lo sviluppo di encefalite autoimmune sperimentale (EAE) o neurite (Racke *et al.*, 1994; Deretzi *et al.*, 1999), un modello per la sclerosi multipla.

Sebbene inizialmente caratterizzata come un fattore di crescita e di sopravvivenza, l'IL-4 si è dimostrato essere capace di sopprimere la crescita di alcune cellule tumorali *in vivo* (Tepper, 1994). Tale inibizione è stata registrata in assenza di linfociti T e dipende da un'eosinofilia infiltrativa e dall'inibizione dell'angiogenesi tumorale.

Il rilascio in sede locale di IL-4 (Saleh, 1999) ha portato alla completa eliminazione dei gliomi formati a livello intracranico e ha fornito protezione da ulteriori recidive da parte del glioma stesso.

IL-4 è stato usato come supporto per la terapia cellulare per il cancro (Rubin e Lotze, 1992). Un bolo di IL-4 ha determinato reazioni con sintomi simil-influenzali, alterazioni gastrointestinali, danni asintomatici al fegato, gravi sintomi allergia-simili a carico della mucosa nasale e sindrome da fuga a livello vascolare (Rubin e Lotze, 1992; Emery *et al.*, 1992; Prendiville *et al.*, 1993).

IL-4 non ha tossicità apparente se somministrato a livello locale. A causa di questi effetti collaterali intollerabili conseguenti a somministrazione sistemica, più recente ci si orienta sempre più verso il trattamento localizzato con IL-4.

2.13 Interleuchina 6 (IL 6)

Introduzione

Interleuchina 6 (IL-6) è una citochina pleiotropica, prodotta da diversi tipi di linfociti, che svolge un ruolo importante in una vasta gamma di risposte quali reazioni immunitarie, reazioni di fase acuta ed ematopoiesi (Van Snick, 1990; Hirano, 1992, 1998).

Struttura genica e proteica

Il gene dell'IL-6 umana ha una lunghezza di circa 5 kb e contiene cinque esoni e quattro introni (Yasukawa *et al.*, 1987; Tanabe *et al.*, 1988).

La somiglianza della sequenza nella regione codificante per i geni dell'IL-6 dell'uomo e del topo è di circa il 60%, in cui la regione 3' non codificante è altamente conservata (Tanabe *et al.*, 1988). Le sequenze di nucleotidi dei geni di IL-6 e G-CSF presentano un'accentuata omologia il che suggerisce un possibile rapporto evolutivo.

La produzione di IL-6 è regolata da una varietà di stimoli; è indotta in linfociti T o cloni di linfociti T stimolati da mitogeni o antigeni (Van Snick *et al.*, 1987; Espevik *et al.*, 1990).

I lipopolisaccaridi (LPS), migliorano la produzione di IL-6 in monociti e fibroblasti mentre i glucocorticoidi la inibiscono (Helfgott *et al.*, 1987; Sehgal, 1992).

Vari virus inducono la produzione di IL-6 in fibroblasti (Sehgal *et al.*, 1988; Van Damme *et al.*, 1989) o nel CNS (Frei *et al.*, 1988) fra cui anche il virus HIV (Emilie *et al.*, 1990).

Anche una varietà di fattori peptidici quali IL-1, TNF, IL-2 e IFN (Van Damme *et al.*, 1987a, b; Kasid *et al.*, 1989), ionofori del calcio (Sehgal *et al.*, 1987) e vari agenti che causano aumento del livello di AMP ciclico intracellulare (Zhang *et al.*, 1988a, b) innescano la produzione di IL-6. Viceversa, IL-4 e IL-13 inibiscono la produzione di IL-6 nei monociti (Gibbons *et al.*, 1990; Minty *et al.*, 1993).

NF-IL6 è il fattore trascrizionale di 32 kDa appartenente ad una famiglia di proteine *DNA-binding* caratterizzato da una cerniera di leucina che determina dimerizzazione e di un dominio basico legante il DNA.

I topi deficienti per NF-IL6 sono altamente sensibili all'infezione da *Listeria monocytogenes*, con macrofagi contenenti un gran numero di agenti patogeni nel citoplasma. Anche la citotossicità mediata da macrofagi in corso di tumori è gravemente compromessa.

TNF e IFN sono note per essere coinvolte nell'attivazione macrofagica e nella formazione di ossido di azoto; tuttavia, l'induzione di G-CSF in macrofagi e fibroblasti non si verifica in assenza di NF-IL6. I risultati indicano pertanto che NF-IL6 ha un ruolo cruciale nell'attività battericida e tumoricida dei macrofagi (Akira *et al.*, 1995).

L'analisi sulla struttura cristallografica dell'ormone della crescita (GH) e di IL-2 ha portato alla previsione della struttura per la maggior parte delle citochine, IL 6 compresa, secondo la quale sarebbe presente una struttura ad andamento sinistrorso con 4 eliche disposte testa testa coda coda legate da due connessioni lunghe ed una corta (Abdel-Megid *et al.*, 1987; Brandhuber *et al.*, 1987).

Studi con diffrazione a raggi X e NMR hanno confermato questa previsione circa altre citochine quali prolattina, eritropoietina, IL-4, G-CSF, GM-CSF, LIF, oncostatina M (OSM) e cardiotropina 1 (CT -1). L'evidenza suggerisce un rapporto evolutivo tra queste molecole che agiscono sul sistema immunitario, emopoietico, endocrino e sul sistema nervoso (Bazan, 1990,

1992; Sprang e Bazan, 1993). Tuttavia, a differenza di altre citochine quali GH, G-CSF e LIF, per IL-6 non è stata segnalata una elica AB-loop (Xu *et al.*, 1996).

La mutagenesi combinata con studi di mappatura di epitopi utilizzando specifici anticorpi monoclonali neutralizzanti IL-6 hanno dimostrato l'importanza di quattro regioni funzionalmente distinte nell'IL-6.

La prima classe di mutanti IL-6, chiamati mutanti di sito 1, mostra un ridotto legame per il recettore IL-6 (Savino *et al.*, 1993). Altre due distinte classi di mutanti IL-6, mutanti per il sito 2 e il sito 3, si legano al recettore dell'IL-6, ma non riescono a generare segnali (Brakenhoff *et al.*, 1994; Ehlers *et al.*, 1994). I mutanti per IL-6 con entrambe le mutazioni nei siti 2 e 3 non solo non riescono a generare segnali, ma funzionano anche come antagonisti nel saggio di proliferazione IL-6-dipendente.

Il quarto sito legante sull'IL-6 è predetto dall'interazione IL-6/IL-6, che potrebbe essere necessaria per l'assemblaggio del complesso recettoriale esamerico funzionale dell'IL-6 (Somers *et al.*, 1997): L'IL-6 solubile infatti si lega al recettore per formare un eterodimero. Inoltre, in presenza di gp130 solubile, si forma un complesso esamerico composto di IL-6, recettore IL-6 solubile e gp130 in un rapporto stechiometrico 2: 2: 2 (Simpson *et al.*, 1997).

Fonti cellulari ed espressione tissutale

IL-6 è prodotta da una varietà di tipi di cellule. Le fonti principali sono i macrofagi, i fibroblasti e le cellule endoteliali.

Altre fonti sono i linfociti T (Espevik *et al.*, 1990); linfociti B (Tanaka *et al.*, 1988); monociti / macrofagi (Sehgal, 1992); eosinofili (Hamid *et al.*, 1992); mastociti (Burd *et al.*, 1989), condrociti (Guene *et al.*, 1990) osteoblasti (Ishimi *et al.*, 1990), linfociti gliali (Yasukawa *et al.*, 1987), astrociti (Yasukawa *et al.*, 1987), cellule del trofoblasto (Kameda *et al.*, 1990), cheratinociti (Grossman *et al.*, 1989), fibroblasti (Van Damme *et al.*, 1989), cellule endoteliali (Astaldi *et al.*, 1980), cellule muscolari lisce (Loppnow e Libby, 1990) cellule mesangiali (Horii *et al.*, 1989; Ruef *et al.*, 1990) e le cellule tiroidee (Bendtzen *et al.*, 1989)

Il recettore per IL-6 consiste di due subunità: la catena α (IL-6R), una glicoproteina transmembrana di 80 kDa che lega IL-6 con bassa affinità, e la catena β (gp130), una glicoproteina transmembrana di 130 kDa che si lega alla IL-6-IL-6R eterodimero per costituire il segnale ad alta affinità trasduttore del complesso.

Attività *in vitro*

Dopo la stimolazione antigenica, i linfociti B proliferano e si differenziano in cellule produttrici di anticorpi sotto il controllo di molte citochine prodotte da linfociti T e macrofagi (Kishimoto e Hirano, 1988). IL-6 è stata identificata quale uno dei fattori che agiscono sui linfociti B in coltura sottoposti a stimolazione con surnatante derivante da cellule mononucleate periferiche stimulate con fitoemoagglutinina (PHA) o con antigene facendo loro produrre immunoglobuline in linee di linfociti B trasformate dal virus Epstein-Barr (EBV) (Muraguchi *et al.*, 1981; Teranishi *et al.*, 1982).

IL-6 agisce su linee di linfociti B a livello di mRNA e induce la biosintesi di Ig di tipo secretorio (Kikutani *et al.*, 1985). L'attivazione trascrizionale è il principale meccanismo per l'incremento di mRNA codificante per Ig secretorie (Raynal *et al.*, 1989).

Gli anticorpi anti-IL-6 inibiscono la produzione di IgE determinata da IL-4, suggerendo che IL-6 endogena svolge un ruolo essenziale nella induzione di IgE IL-4-dipendente (Vercelli *et al.*, 1989); IL-4 infatti induce la produzione di IL-6 in linfociti B umani sani (Smeland *et al.*, 1989).

IL-6 e IL-1 stimolano in maniera sinergica la crescita e la differenziazione di linfociti B murini attivati con anti-Ig o destrano solfato (Vink *et al.*, 1988). Inoltre, IL-6 aumenta la produzione di IgA in linfociti B murini derivanti da placche del Peyer (Beagley *et al.*, 1989; Kunitomo *et al.*, 1989) o di linfociti umane esprimenti il recettore per IL-6 (Fujihashi *et al.*, 1991). Questo effetto di IL-6 non è il risultato di uno *switching* isotipico, in quanto linfociti B privi di IgA legate alla membrana non sono stati indotti a secernere IgA da parte di IL-6 (Beagley *et al.*, 1989). Questi fatti indicano che IL-6 svolge un ruolo nella risposta immunitaria a livello mucosale (Fujihashi *et al.*, 1992).

Coerentemente con questi risultati, topi transgenici o muniti di un retrovirus esprimente IL-6 mostrano una massiccia plasmacitosi e ipergammaglobulinemia (Suematsu *et al.*, 1989; Brandt *et al.*, 1990). Tutti questi risultati mostrano che IL-6 svolge ruoli nella produzione di Ig *in vivo*.

IL-6 è coinvolto nell'attivazione, crescita e differenziazione dei linfociti T (Van Snick, 1990; Houssiau e Van Snick, 1992). L'IL-6 induce l'espressione di CD25, il recettore per IL-2 in linee cellulari T (Noma *et al.*, 1987) e in timociti (Le *et al.*, 1988), e funziona come un secondo segnale per la produzione di IL-2 da parte di linfociti T (Garman *et al.*, 1987).

IL-6 promuove la crescita di linfociti T umani stimolati con PHA (Houssiau *et al.*, 1988; Lotz *et al.*, 1988) e di linfociti T periferici murini; esso agisce anche sui timociti murini inducendone la proliferazione (Uyttenhove *et al.*, 1988).

Gli effetti di IL-6 sono sinergici a quelli di IL-1 e del TNF α (Le *et al.*, 1988). IL-6 aumenta la proliferazione di timociti in risposta a IL-4 e PMA (Hodgkin *et al.*, 1988). Poichè IL-6 stimola la proliferazione dei timociti e IL-1 può far produrre in questi IL 6 (Helle *et al.*, 1989), gli effetti di IL-1 sulla proliferazione dei timociti potrebbe essere mediata dall'induzione di IL-6.

L'anticorpo anti-CD25 generalmente inibisce la proliferazione linfociti T indotta da IL-6 (Tosato *et al.*, 1990). IL-1 e IL-6 inducono la produzione di IL-2 in maniera sinergica (Holsti e Raulat, 1989; Houssiau *et al.*, 1989) e l'espressione di CD25 in linfociti T (Houssiau *et al.*, 1989). IL-6 induce anche la differenziazione dei linfociti T citotossici (CTLs), in presenza di IL-2 da timociti e linfociti T splenici (Uyttenhove *et al.*, 1988). Utilizzando linfociti T murini purificati, sia IL-1 che IL-6 si sono state dimostrate necessarie per la generazione di CTLs e l'induzione di CD25 e IL-2 (Renauld *et al.*, 1989). IL-6 induce anche la serina esterasi e la perforina, necessarie per mediare la lisi delle cellule bersaglio dei granuli presenti in CTLs (Takai *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1990), suggerendo un ruolo nella differenziazione ed espressione della funzione da parte dei CTL.

IL-6 e IL-3 sinergicamente inducono la proliferazione delle cellule progenitrici ematopoietiche pluripotenti murine *in vitro* (Ikebuchi *et al.*, 1987). La combinazione di IL-6 e IL-3 agisce su cellule blastiche formanti colonie provocando un loro abbandono precoce della G0 nel ciclo di replicazione cellulare. IL-6 sembra innescare l'entrata nel ciclo cellulare di cellule progenitrici quiescenti mentre IL-3 è in grado di supportare la continua proliferazione di progenitori dopo la loro uscita dalla fase G0 (Ogawa, 1992). Le unità formanti colonie nella milza (CFU-S), sono aumentate coltivando cellule di midollo osseo in presenza di IL-6 associate a IL-3 (Okano *et al.*, 1989b). Le cellule di midollo osseo in coltura con IL-3 e IL-6 hanno mostrato un maggior sopravvivenza in topi letalmente irradiati rispetto a cellule in coltura con sola IL-3. Questi dati indicano che la combinazione di IL-6 e IL-3 stimola le cellule staminali ematopoietiche *in vitro* e potrebbe quindi essere applicata nel trapianto di midollo osseo.

IL-6 agisce in sinergia con M-CSF nella formazione delle unità che formano colonie-macrofagi (CFU-M), con riguardo sia al numero che alle dimensioni delle colonie stesse (Bot *et al.*, 1989).

Una delle interessanti relazioni fra IL-6 e sistema emopoietico è che un difetto di differenziazione dell'ematopoiesi in corso di anemia di Fanconi può essere causato da un deficit di produzione di IL-6 (Rosselli *et al.*, 1992). Coerentemente con il possibile ruolo di IL-6 su cellule staminali ematopoietiche, topi IL-6-deficienti hanno mostrato una diminuzione del numero assoluto di CFU-S e progenitori pre-CFU-S e una ridotta funzionalità a lungo termine nel ripopolamento di cellule staminali.

In vitro la megacariopoiesi è supportata da diversi fattori di stimolazione CSFs.

IL-6 è stata trovata indurre la maturazione dei megacariociti in sinergia con IL-3 (Ishibashi *et al.*, 1989b) promuovendone un marcato incremento nelle dimensioni e nell'attività dell'acetil colinesterasi,

Il ruolo di IL-6 sullo sviluppo dei megacariociti è ulteriormente dimostrato dal fatto che anticorpi monoclonali contro IL-6 inibiscono lo sviluppo dei megacariociti in colture cellulari di midollo osseo indipendentemente dall'assenza o presenza di IL-3 (Lotem *et al.*, 1989). Megacariociti umani hanno dimostrato esprimere il recettore per IL-6 e produrre IL-6 suggerendo come essa disciplini la fase terminale di maturazione dei megacariociti in un modo autocrino (Hegyí, *et al.*, 1990).

Il numero dei megacariociti maturi nel midollo osseo si è visto aumentare in topi IL-6 transgenici (Suematsu *et al.*, 1989); Inoltre, si è riscontrato che la somministrazione di IL-6 aumenta il numero delle piastrine in topi (Ishibashi *et al.*, 1989a) e scimmie (Asano *et al.*, 1990).

Per quanto riguarda il coinvolgimento di IL-6 nella granulopoiesi, la somministrazione di IL-6 stimola la granulopoiesi *in vivo*, in assenza di segnali da parte del recettore per G-CSF.

I topi mancanti del recettore per G-CSF hanno un grave difetto di granulopoiesi quantitativa, anche se fenotipicamente presentano dei neutrofili normali.

I topi deficitari sia di IL-6 che del recettore per G-CSF mostrano una neutropenia notevolmente più grave rispetto a quella di topi deficienti del solo recettore per G-CSF.

Numeri pressochè normali di cellule progenitrici mieloidi sono stati rilevati nel midollo osseo di topi deficienti per IL-6 e del recettore per G-CSF oltre ad una differenziazione fino ad una terminale fase di maturazione dei neutrofili. Questi risultati dimostrano che l'IL-6 è un regolatore di granulopoiesi *in vivo* (Liu *et al.*, 1997).

La biosintesi di proteine di fase acuta da parte degli epatociti è regolata da diversi fattori tra cui IL-1, TNF α e il fattore stimolante gli epatociti (HSF). Si è riscontrato che IL-6 ricombinante agisce allo stesso modo di HSF (Gauldie *et al.*, 1987). Inoltre, l'attività di HSF può essere neutralizzata da anti-IL-6 (Andus *et al.*, 1987), il che indica che l'attività di HSF è esercitata dalla stessa IL-6 (Heinrich *et al.*, 1990; Gauldie *et al.*, 1992). IL-6 può indurre una varietà di proteine di fase acuta, come ad esempio il fibrinogeno, l'antichimotripsina 1, la glicoproteina acida di tipo 1 e l'aptoglobulina in linee cellulari di epatoma umana.

In aggiunta a queste proteine essa induce siero amiloide A, proteina C-reattiva (CRP) e antitripsina 1 in epatociti umani (Castell *et al.*, 1988). Questi risultati confermano l'effetto *in vivo* di IL-6 nelle reazioni di fase acuta.

E' stato riportato che i livelli sierici di IL-6 correlano in buona misura con quelli di proteina C reattiva (CRP) e con la febbre in pazienti con gravi ustioni (Nijsten *et al.*, 1987) e un aumento della concentrazione sierica di IL-6 è stato osservato prima dell'aumento del livello di CRP nel siero in fase di interventi chirurgici (Nishimoto *et al.*, 1989; Shenkin *et al.*, 1989), a dimostrare il legame fra ruolo svolto dall'IL-6 e proteine di fase acuta. Infatti topi IL-6-deficienti mancano

totalmente di una risposta di fase acuta in seguito a danni ai tessuti o infezioni (Kopf *et al.*, 1994).

IL-6 e TNF α sono importanti componenti delle principali modalità di segnalazione precoce per la rigenerazione epatica (Michalopoulos et DeFrances, 1997). In una fase molto precoce della risposta di rigenerazione del fegato, TNF α induce la produzione di IL-6 e la rapida attivazione di un insieme di fattori di trascrizione come STAT3, NF κ B e AP-1 (Diehl *et al.*, 1994).

Nei recettori TNF α di tipo I di topi IL-6 deficienti, la sintesi del DNA dopo epatectomia parziale è gravemente compromessa e non avviene l'attivazione di NF κ B e STAT3 (Cressman *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997). La somministrazione di una sufficiente quantità di IL-6 è in grado di riparare il difetto di sintesi del DNA, la rigenerazione degli epatociti e i danni al fegato. Senza epatectomia, IL-6 non stimola la proliferazione epatocitaria tanto che topi transgenici per IL-6 non mostrano alcuna alterazione morfologica del fegato. Si può dedurre come IL-6 sia di fondamentale importanza per la rigenerazione del fegato e non può essere sostituito da altre citochine endogene.

Sono stati creati anche topi transgenici per IL 6 e il suo recettore (Maione *et al.*, 1998). In contrasto con topi transgenici per uno solo di questi fattori, i topi transgenici aventi tali caratteristiche sviluppano una progressiva ematopoiesi extramidollare in fegato e milza.

In aree periportali epatiche, livelli elevati di entrambi i transgeni inducono gli epatociti a proliferare e provocano un precoce sviluppo di noduli iperplastici che imitano fortemente l'iperplasia rigenerativa nodulare del fegato. La malattia è caratterizzata da una diffusa trasformazione micronodulare del parenchima epatico che alla fine porta alla formazione di grandi adenomi del fegato. Questi risultati sostengono il ruolo di IL-6 come una delle principali citochine responsabili di proliferazioni fisiologiche e patologiche del parenchima epatico.

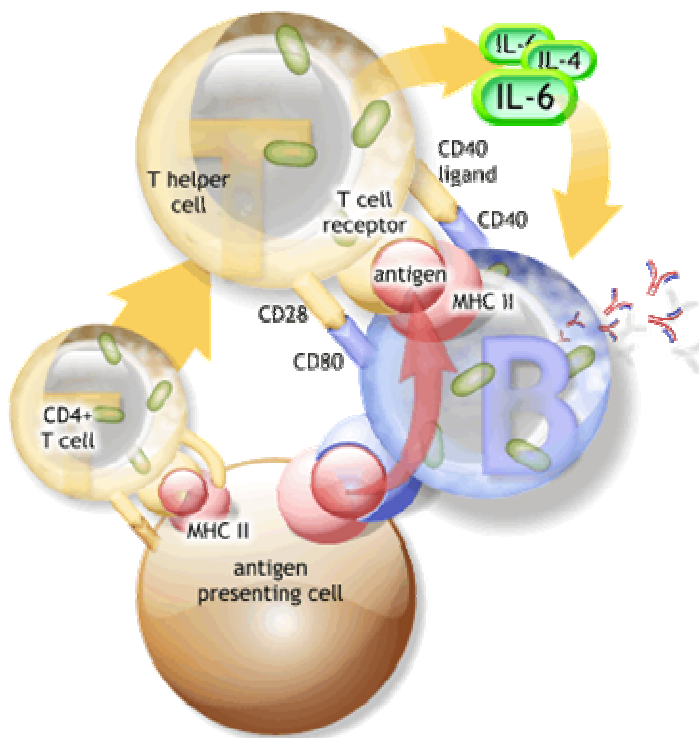


Fig. 2.8 Espressione di Interleuchina 6 da parte di linfociti T helper stimolati.

La stimolazione con IL -1 di cellule di glioblastoma o astrocitoma induce l'espressione di IL-6 (Yasukawa *et al.*, 1987). Le cellule della microglia e gli astrociti infetti da virus producono IL 6, indicando un possibile coinvolgimento di IL-6 nelle funzioni delle cellule nervose. IL-1 e TNF sono importanti induttori di IL-6 negli astrociti. Neurotrasmettitori come sostanza P,

noradrenalina, adenosina e istamina sono stati segnalati indurre la produzione di IL-6 negli astrociti. I lipolisaccaridi (LPS) sono una delle importanti sostanze capaci di indurre IL-6 nella microglia.

Diversi studi utilizzando la trascrizione inversa associata alla reazione a catena della polimerasi (RT-PCR) e tecniche di ibridazione in situ hanno dimostrato che le cellule del CNS esprimono IL-6 e recettori per tale citochina. mRNA IL-6 e IL-6 recettore sono rilevati in diverse regioni del cervello, tra cui l'ippocampo, ipotalamo, neocortex, cervelletto e tronco encefalico. I loro livelli di mRNA tendono ad essere più elevati nelle strutture del proencefalo piuttosto che in regioni caudali.

Nell'ippocampo, i livelli di espressione di mRNA codificante per IL-6 diminuiscono durante lo sviluppo, mentre l'mRNA codificante per il recettore dell'IL-6 aumenta, il che suggerisce che l'espressione di IL-6 e del suo recettore sono regolati in maniera diversa in questa regione del SNC.

Lo sviluppo temporale dell'espressione del recettore per IL-6 nell'ipotalamo sembra essere legata alla maturazione dell'asse ipotalamo-pituitario-surrenalica (HPA), coerentemente con il ruolo svolto dall'IL-6 nella regolamentazione del rilascio di ormoni. IL-6 stimola la secrezione di ormone adrenocorticotropo attraverso il rilascio di ormone-corticotropina (Naitoh *et al.*, 1988) ed anche direttamente (Fukata *et al.*, 1989). Inoltre IL-6 stimola anche il rilascio di una serie di ormoni dall'ipofisi anteriore come prolattina, ormone della crescita e ormone luteinizzante (Spangelo *et al.*, 1989).

IL-6 è rilasciato dal SNC durante varie condizioni patologiche, tra cui complesso di demenza dell'AIDS, morbo di Alzheimer, sclerosi multipla, lupus eritematoso sistemico, trauma del CNS e meningite batterica e virale (Gruol *et Nelson*, 1997).

Attività *in vivo*

L'osteoporosi è una delle principali cause di morbilità negli anziani. Una varietà di composti, tra cui ormoni, sostanze nutritive e citochine modulano il rimodellamento osseo.

IL-6 aumenta con l'età e la menopausa. Inoltre, murini modelli suggeriscono che IL-6 svolge un ruolo centrale nel riassorbimento osseo (Ershler *et al.*, 1997). Deficit di estrogeni provocano una marcata perdita di tessuto osseo stimolando il riassorbimento osseo osteoclastico.

Le concentrazioni di IL-1, IL-6, recettore per IL-6 e prostaglandine rilevate nel midollo osseo di topi ovariectomizzati sono insufficienti per determinare un aumento del riassorbimento osseo causato da assenza di estrogeni.

L'aumento del riassorbimento osseo indotto da ovariectomia può essere spiegato da un effetto cumulativo di queste citochine (Pacifci, 1996). IL-6 da sola non è in grado di indurre la formazione degli osteoclasti in co-cultura di cellule del midollo osseo e osteoblasti.

Il recettore solubile per l'IL-6 sorprendentemente stimola la formazione degli osteoclasti indotta da IL-6. In presenza di desametasone, IL-6 da solo può indurre la formazione degli osteoclasti, e il trattamento di cellule osteoblastiche con tale antinfiammatorio induce un marcato aumento dell'espressione del recettore per IL-6 (Udagawa *et al.*, 1995).

Il deficit di estrogeni indotto da ovariectomia determina una significativa perdita di matrice ossea insieme ad un aumento dei tassi di *turnover*.

Questi risultati indicano che IL-6 svolge un ruolo importante nella regolazione locale di *turnover* osseo e, almeno nei topi, sembra essere essenziale per la perdita di tessuto osseo causato da deficit di estrogeni. In linea con ciò, il maggiore sviluppo degli osteoclasti in topi ovariectomizzati è impedito dalla somministrazione di anticorpi anti-IL-6 (Jilka *et al.*, 1992) e gli estrogeni si sono mostrati in grado di inibire la produzione di IL-1 e TNF α indotta da IL-6 (Girasole *et al.*, 1992).

Poichè IL-6 stimola la lipogenesi epatica nei topi, e IL-6 è indotta dal TNF α , gli effetti di lipogenesi del TNF α possono essere in parte mediati da IL-6 (Grunfeld *et al.*, 1990). L'IL-6 è prodotta da cellule della muscolatura liscia vascolare (Loppnow e Libby, 1990) e tale citochina potrebbe essere coinvolta nella loro crescita cellulare (Nabata *et al.*, 1990), suggerendo un possibile ruolo di IL-6 nell'arteriosclerosi. L'iniezione intraperitoneale di LPS associato a IL-1 non provoca una risposta febbrile in topi IL-6-deficienti, effetto che viene ristabilito nel momento in cui si inietta per via intracerebroventricolare dell'IL 6 ricombinante ma non IL-1 e LPS (Chai *et al.*, 1996).

L'IL-6 è un fattore di crescita per varie cellule tra cui plasmocitomi, mielomi e ibridomi. D'altro canto, IL-6 agisce come inibitore della crescita per un certo numero di linee cellulari derivanti da carcinomi e leucemie, tra cui il carcinoma mammario e il carcinoma ovarico (Revel, 1992).

In topi IL-6-deficienti, il numero di timociti e linfociti T periferici sono costantemente ridotti del 20-40% rispetto ai controlli (Kopf *et al.*, 1994). Le cellule spleniche di topi IL-6-deficienti e *wild type* mostrano livelli e cinetiche simili nell'espressione del recettore per IL-2 dopo stimolazione con Con A. Il numero di linfociti B nel midollo osseo e milza sono normali, e la loro espressione di IgM, IgD e CD23 è entro il normale range. I topi IL-6-deficienti mostrano una ridotta risposta IgG ma non della risposta IgM per quanto riguarda la risposta alle proteine antigeniche solubili e al virus della stomatite vescicolare (Kopf *et al.*, 1994).

Un effetto è stato osservato nella risposta anticorpale mucosale IgA in topi IL-6-deficienti: il numero delle cellule produttrici di IgA è stato notevolmente ridotto (Ramsay *et al.*, 1994). Questa ridotta risposta IgA è stato completamente ristabilita dopo infezione endonasale con vaccinia virus IL-6 ricombinante. Inoltre, topi IL-6-deficienti infettati per via intranasale con virus ricombinante vaccinia esprime la glicoproteina dell'emagglutinina (HA) del virus influenzale hanno fortemente ridotto il numero di cellule in grado di produrre anticorpi IgG e IgA specifici per HA. Allo stesso modo, l'iniezione intraduodenale di ovoalbumina ha portato a una ridotta risposta IgA.

In contrasto, in topi IL-6-deficienti dopo inoculazione con *Helicobacter felis* o ripetuta immunizzazione orale con proteine solubili in presenza della tossina del colera, sono state osservate normali risposte della mucosa IgA ed IgG (Bromander *et al.*, 1996).

Tali risultati discordanti possono essere spiegati con il fatto che tali risposte probabilmente riflettono la dipendenza nei confronti del complemento: la componente del complemento C3 svolge un ruolo importante nella produzione di anticorpi e nello sviluppo dei centri germinativi. La produzione locale di C3 e la formazione dei centri germinativi sono alterati in topi IL-6-deficienti (Kopf *et al.*, 1998). I centri germinativi di topi deficienti per IL-6 e componente C3 del complemento hanno un difetto simile nella produzione di anticorpi IgG2a e IgG2b (Kopf *et al.*, 1998). Pertanto, la produzione di C3 indotta da IL-6 sembra svolgere un ruolo importante per la generazione di anticorpi ad alta affinità all'interno dei centri germinativi.

In topi IL-6-deficienti, i linfociti T mostrano una normale espressione delle catene α , β , γ , e ζ del recettore TCR e dei marker CD4, CD8, CD44, CD24.

La generazione di linfociti citotossici (CTLs) e la loro attività litica è stata ridotta in topi IL-6-deficienti infettati (Kopf *et al.*, 1994). L'attivazione dei linfociti T helper e la differenziazione in sottofamiglie dei linfociti T non è risultata significativamente alterata in topi IL-6-deficienti.

In tali soggetti è stata rilevata una incapacità nell'eliminare *Listeria monocytogenes* (Kopf *et al.*, 1994; Dalrymple *et al.*, 1995); questa incapacità è probabilmente determinata da un deficit dei neutrofili, suggerendo come IL-6 svolga un ruolo critico nella listeriosi stimolando tale linea cellulare (Dalrymple *et al.*, 1995).

Topi IL-6-deficienti mostrano un aumento della suscettibilità alle infezioni sostenute da *Escherichia coli* e non sono in grado di indurre neutrofilia in conseguenza a infezione sperimentale con *E. coli* (Dalrymple *et al.*, 1996). Questi risultati indicano un ruolo nelle funzioni dei macrofagi e dei neutrofili *in vivo*.

La rigenerazione del nervo ipoglosso nevretozzato *in vivo*, è stato notevolmente ritardato dalla somministrazione di anticorpi anti- recettore per IL-6. In topi transgenici esprimenti IL-6 e recettore solubile dell'IL-6, la rigenerazione del nervo nevretozzato è stato sorprendentemente accelerata nei topi rispetto ai controlli non transgenici (Hirota *et al.*, 1996). Si è potuto concludere pertanto che il segnale apportato da IL-6 può svolgere un ruolo importante nella rigenerazione del nervo dopo traumi *in vivo*.

I pazienti con mixoma cardiaco mostrano una varietà di sintomi autoimmuni, come ipergammaglobulinemia, presenza di autoanticorpi e aumento delle proteine di fase acuta. La produzione di IL-6 da parte di cellule di mixoma cardiaco ha da subito suggerito il possibile coinvolgimento di IL-6 in anomalie dei linfociti B e malattie autoimmuni (Hirano *et al.*, 1987; Jourdan *et al.*, 1990). Prima di questa ricerca, era stato dimostrato che cellule presenti nel versamento pleurico di pazienti con tubercolosi polmonare, quando stimolate con derivato proteico purificato, producono una grande quantità di fattori in grado di indurre la produzione di Ig in linfociti B attivati (Hirano *et al.*, 1981). Uno di questi fattori è stato identificato essere l'IL-6 (Teranishi *et al.*, 1982; Hirano *et al.*, 1984a, b). È ormai noto che i pazienti con tubercolosi polmonare hanno spesso una vasta gamma di autoanticorpi (Shoenfeld e Isenberg, 1988), e, in alcuni casi, è segnalata un'importante ipergammaglobulinemia diffusa (Sela *et al.*, 1987).

IL-6 è stato trovato anche essere prodotto da isole pancreatiche β e cellule tiroidee (Bendtzen *et al.*, 1989; Campbell e Harrison, 1990), suggerendo come IL-6 possa essere coinvolta nel diabete di tipo I (Campbell *et al.*, 1991). L'osservazione che anticorpi anti-IL-6 inibiscono lo sviluppo di diabete insulino-dipendente in topi può supportare il ruolo di IL-6 nella forma di malattia autoimmune (Campbell *et al.*, 1991).

La produzione di IL-6 è stata osservata anche nei pazienti con artrite reumatoide (Hirano *et al.*, 1988; Bhardwaj *et al.*, 1989), in modelli murini di artrite collagene indotta di tipo II (Takai *et al.*, 1989) e in topi transgenici che sviluppano malattia autoimmune con glomerulonefrite proliferativa e artrite (Tang *et al.*, 1991), rafforzando ulteriormente il profondo rapporto tra IL-6 e alcune malattie autoimmuni. Nel complesso, le prove suggeriscono che IL-6 svolge un ruolo nelle malattie autoimmuni, anche se da sola non è sufficiente per generarle (Hirano, 1992).

Il reclutamento di IL-6 nella patogenesi delle malattie autoimmuni è stato dimostrato in modelli di artrite murina e nell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE).

In topi IL-6-deficienti, la cartilagine articolare è stata ben conservata. Le cellule linfonodali di topi IL-6-deficienti producono molte più citochine di tipo Th2 rispetto a topi wild-type sottoposti a stimolazione antigene-specifica o aspecifica di cultura *in vitro* (Ohshima *et al.*, 1998). Sono state studiate l'artrite collagene-indotta (CIA) e la poliartrite infiammatoria in topi transgenici per TNF in relazione alla presenza di IL-6 per l'insorgenza della malattia.

I topi IL-6-deficienti sono stati completamente protetti dalla CIA, in presenza di ridotta risposta anticorpale al collagene di tipo II e alla mancanza di cellule infiammatorie e danni ai tessuti e delle articolazioni del ginocchio, mentre l'artrite in topi transgenici per TNF α non è stata influenzata dall'inattivazione del gene IL-6. Questi risultati suggeriscono che IL-6 è un fattore critico per la CIA (Alonzi *et al.*, 1998).

L'EAE provocata dalla glicoproteina mielinica degli oligodendrociti (MOG) è indicato come il modello animale di sclerosi multipla (SM). I topi IL-6-deficienti erano resistenti a EAE indotta dalla MOG (Okuda *et al.*, 1998). Nessuna infiltrazione di cellule infiammatorie è stato osservata nel sistema nervoso centrale di topi IL-6-deficienti.

Le malattie infiammatorie croniche proliferative possono essere classificate come patologie in cui vanno a perpetrarsi infiammazione cronica e reazioni immunologiche con prolungata proliferazione cellulare e lesioni alla base della manifestazione di una varietà di sintomi.

Le glomerulonefriti proliferative delle cellule mesangiali, la psoriasi, il sarcoma di Kaposi possono essere classificate come tali. Da questo punto di vista, anche l'artrite reumatoide è considerata in questa categoria, poichè una delle sue caratteristiche prominente è la proliferazione cronica di cellule sinoviali.

La glomerulonefrite è accompagnata da una sequela di reazioni autoimmuni, e diversi fattori di crescita sono stati proposti come candidati nell'indurre la crescita patologica di cellule mesangiali (Horii *et al.*, 1989; Ruef *et al.*, 1990). IL-6 è un possibile fattore di crescita autocrino per le cellule mesangiali di ratto. Essa è prodotta da cellule mesangiali renale nei pazienti con glomerulonefrite proliferativa (Horii *et al.*, 1989). IL-6 è rilevata nelle urine di campioni provenienti da pazienti con glomerulonefrite proliferativa mesangiale, ma non da quelli di altri tipi di glomerulonefrite. C'è una correlazione tra livello di IL-6 nelle urine e la progressiva fase di glomerulonefrite proliferativa mesangiale.

Topi transgenici, nei quali il gene IL-6 è guidato dal gene promotore I metallotioneina, mostrano una progressiva patologia renale, in cui la glomerulonefrite membranosa iniziale è seguita da glomerulosclerosi focale e infine da danni estesi a livello tubulare. Questo è simile al danno osservata in pazienti in fase terminale di mieloma multiplo (Fattori *et al.*, 1994a).

Altre malattie infiammatorie croniche proliferative che possono essere correlate a IL-6 sono la psoriasi (Grossman *et al.*, 1989) e il sarcoma di Kaposi (Miles *et al.*, 1990), in cui l'IL-6 è considerato come uno dei fattori di crescita per cheratinociti e per cellule appartenenti al sarcoma di Kaposi.

IL-6 è sintetizzata e rilasciata dalla normale epidermide umana (Paquet e Pierard, 1996). I cheratinociti esprimono sia IL-6 sia il suo recettore. IL-6 ha dimostrato di stimolare la proliferazione dei cheratinociti *in vitro*. Una sovrapproduzione di IL-6 è osservata nel surnatante di colture cellulari di cheratinociti affetti da psoriasi (Grossman *et al.*, 1989) con localizzazione citoplasmatica.

Le cellule AIDS-correlate del sarcoma di Kaposi (KS-AIDS) sintetizzano e rilasciano grandi quantità di IL-6 sia *in vitro* sia *in vivo*. Queste cellule sono in possesso anche del recettore per IL-6 e proliferano in risposta a tale citochina; essa pertanto agisce come fattore di crescita in maniera autocrina (Miles *et al.*, 1990). Di notevole interesse è il risultato che HHV-8 o sarcoma di Kaposi associato ad herpesvirus (KSHV), che si identifica con alta frequenza in tutte le forme epidemiologiche del sarcoma di Kaposi, codifica per un omologo strutturale di IL-6, chiamata IL-6 virale (vIL-6) (Moore *et al.*, 1996; Neipel *et al.*, 1997; Nicholas *et al.*, 1997a, b).

IL-6 è un potente fattore di crescita per cellule di plasmocitoma murino (Van Damme *et al.*, 1987a, b; Van Snick *et al.*, 1988) e cellule di mieloma umano (Kawano *et al.*, 1988) suggerendo il possibile coinvolgimento di IL-6 nella generazione di plasmocitoma o mieloma (Hirano, 1991).

L'espressione del gene codificante per IL-6 in linea cellulari murine di plasmocitoma IL-6-dipendenti ha determinato una proliferazione di linfociti in un modo autocrino (Tohyama *et al.*, 1990; Vink *et al.*, 1990). Queste cellule hanno mostrato un aumento della tumorigenicità tanto

che anticorpi monoclonali in grado di bloccare il legame dell'IL-6 al suo recettore si sono rivelati inibire la loro crescita *in vivo* (Vink *et al.*, 1990).

Tuttavia è argomento di discussione il fatto se tutte le cellule del mieloma siano capaci di produrre IL-6, perché solo alcune linee di linfociti di mieloma sono stati riscontrate produrla (Hata *et al.*, 1990), e cellule del midollo osseo aderenti piuttosto che non aderenti contenenti cellule di mieloma sono state dimostrate essere i maggiori produttori di IL-6 (Klein *et al.*, 1989). In ogni caso, le prove indicano che IL-6 svolge un ruolo importante nella crescita *in vitro* di linfociti di mieloma e la generazione di neoplasia in plasmacellule.

Ciò è ulteriormente supportato dai seguenti risultati. Aumentati livelli sierici di IL-6 correlano con la gravità della malattia in mieloma multiplo e leucemia plasmocellulare (Bataille *et al.*, 1989). La somministrazione di anticorpi anti-IL-6 sopprime la crescita di mieloma (Klein *et al.*, 1991). Inoltre STAT3, che è una importante molecola di segnalazione attivata mediante il recettore IL-6 e coinvolta nell'espressione di IL-6 ad attività biologica, è fortemente attivata in cellule mononucleate del midollo osseo in pazienti con mieloma multiplo (Catlett-Falcone *et al.*, 1999). Questi risultati forniscono elementi di prova che IL-6 contribuisce alla patogenesi del mieloma multiplo.

IL-6 da sola non può, tuttavia, essere sufficiente per la generazione di plasmocitoma. Plasmacellule generate in topi transgenici per IL-6 non sono trapiantabili in topi singenici, il che indica come altri fattori siano richiesti per una trasformazione maligna.

Le prove sostengono con forza l'ipotesi che la deregolamentata espressione del gene IL-6 può attivare una plasmacitosi policlonale con conseguente generazione di plasmocitoma maligno (Hirano, 1991).

In relazione a questo problema, i centri germinativi di linfonodi iperplastici di pazienti con malattia di Castleman, producono grandi quantità di IL-6 (Yoshizaki *et al.*, 1989). La malattia Castleman è una rara malattia linfoproliferativa dei linfociti B caratterizzata da iperplasia linfonodale con infiltrazione plasmatica cellulare, febbre, anemia, ipergammaglobulinemia e un aumento del livello plasmatico di proteine di fase acuta.

Terapia

E' stato dimostrato che la somministrazione di IL-6 con IL-3 aumenta il numero delle piastrine (Ishibashi *et al.*, 1989a; Asano *et al.*, 1990). Una combinazione di questi fattori può essere utile per il controllo effettivo di trombocitopenia e anemia. Una varietà di inibitori di IL-6, come ad esempio l'anticorpo monoclonale anti-IL-6, sono stati utilizzati per il trattamento di pazienti affetti da mieloma multiplo e artrite reumatoide (Elliott e Maini, 1995; Matsuno *et al.*, 1998). La proteina di fusione composta da IL-6 e recettore solubile di IL-6 è stata utilizzata per stimolare i linfociti esprimenti gp130, ad esempio, per espandere le cellule staminali ematopoietiche (Fischer *et al.*, 1997) e accelerare la rigenerazione del fegato in pazienti con epatite .

2.14 Interleuchina 8 (IL-8)

Introduzione

L'interleuchina 8 (IL-8) è una chemochina proinfiammatoria prodotta da vari tipi di cellule infiammatorie in seguito a stimolazione ed esercita una serie di funzioni su leucociti e particolarmente sui neutrofili.

Struttura genica e proteica

L'analisi strutturale di IL-8 ricombinante mediante risonanza magnetica (Clowre *et al.*, 1990) e da cristallografia a raggi X (Baldwin *et al.*, 1990, 1991) ha rivelato che l'IL-8 è un dimero che consta di sei filamenti e due eliche antiparallele. Curiosamente, l'IL-8 ha una struttura simile al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I. Tuttavia, non è noto se la forma dimerica abbia un suo significato fisiologico, in quanto il monomero di IL-8 è ugualmente attivo *in vitro* verso i neutrofili (Rajaratnam *et al.*, 1994).

IL-8 è un prototipo della 'superfamiglia delle chemochine', che consiste di oltre 40 diverse molecole (Oppenheim *et al.*, 1991). IL-8 appartiene più precisamente alla sottofamiglia di chemochine CXC, che consiste di molecole ormai conosciute non solo per regolare la migrazione di diversi tipi di leucociti, ma anche il movimento di cellule progenitrici ematopoietiche e di linfociti.

Il motivo Glu-Leu-Arg (ELR), e la regione N-terminale dell'IL-8 è essenziale per il suo legame ai recettori (Herbert *et al.*, 1991). Questo motivo è importante anche per l'azione chemiotattica espressa verso i neutrofili e l'attività angiogenica svolte da altre chemochine CXC che si legano a recettori CXCR2 (Clark-Lewis *et al.*, 1993). Tuttavia, alcune chemochine ELR-CXC, come il fattore di derivazione stromale 1 (SDF-1), inibiscono l'angiogenesi.

L'IL-8 secreta non è glicosilata. Le varianti dell'IL-8 sono derivate da sequenziale clivaggio dalla regione N-terminale della molecola. *In vitro*, la forma di IL-8 maggiormente attiva è il modulo di 72 aminoacidi. L'IL-8 di 77 aminoacidi derivante da cellule endoteliali è stata riportata solo per indurre apoptosi verso i leucociti (Terui *et al.*, 1998). Tuttavia, il ruolo fisiopatologico di queste varianti *in vivo* resta da stabilire.

Fonti cellulari ed espressione tissutale

L'IL-8 è prodotta da vari tipi di cellule infiammatorie in seguito a vari stimoli ed esercita una serie di funzioni su leucociti, e in particolare neutrofili *in vitro*. Recenti studi dimostrano che l'inibizione di IL-8 mediante somministrazione di specifici anticorpi o interruzione del gene codificante per il recettore IL-8 riduce drasticamente l'infiltrazione dei neutrofili in tessuti in fase di infiammazione acuta. L'IL-8 svolge un ruolo fondamentale nella infiammazione acuta attraverso il reclutamento e l'attivazione di tale componente cellulare.

IL-8 è secreta da molti tipi di cellule, tra cui monociti, linfociti, granulociti, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule epiteliali bronchiali, cheratinociti, epatociti, cellule mesangiali e condrociti. L'IL-8 secreta da tessuti infiammati viene interiorizzata e trasportata attraverso le cellule endoteliali (Middleton *et al.*, 1997). La porzione C-terminale dell'IL-8 è essenziale per l'internalizzazione così come per il legame con l'eparina.

I lipopolisaccaridi e le citochine infiammatorie determinano un aumento nella produzione di IL-8 e allo stesso tempo sono in grado di attivare il NF- κ B. Al contrario IL-4, IL-10, TGF β , alcuni interferoni e i farmaci immunosoppressivi come i glucocorticoidi, oltre che la vitamina D3 inibiscono l'espressione del gene codificante per IL-8 (Okamoto *et al.*, 1994) attraverso l'effetto sul NF- κ B.

Attività *in vitro*

IL-8 svolge una potente azione chemioattrattiva verso i neutrofili, ma *in vitro* IL-8 va ad attivare anche un gran numero di funzioni da parte di queste tipologie di cellule come il rilascio di enzimi lisosomiali, la generazione di superossido, un'aumentata espressione di molecole di adesione sui neutrofili come dimostrato da Peveri *et al.* (1988), Schroder (1989), e Paccaud *et al.* (1990), rispettivamente.

IL-8 svolge anche attività di chemiotassi verso basofili, eosinofili citochine-stimolati, linfociti T del sangue periferico come dimostrato da White *et al.* (1989), Warringa *et al.* (1991), e Larsen *et al.* (1989), rispettivamente.

Interessantemente, IL-8 aumenta anche l'adesione di neutrofili a cellule non stimolate della vena del cordone ombelicale umano, ma inibisce l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali prestimate da citochine infiammatorie quali IL-1 e del TNF (Gimbrone *et al.*, 1989).

IL-8 migliora la migrazione dei neutrofili attraverso l'endotelio (Huber *et al.*, 1991), e induce l'angiogenesi nella cornea di ratto senza indurre infiltrazione leucocitaria (Koch *et al.*, 1992). Queste funzioni da parte dell'IL-8 suggeriscono l'importante ruolo svolto dall'IL-8 in corso di flogosi così come nella difesa ospite. D'altra parte, IL-8 aumenta la replicazione virale compresa quella di citomegalovirus in fibroblasti umani (Murayama *et al.*, 1994), inibendo l'attività antivirale dell'IFN (Khabar *et al.*, 1997).

Attività *in vivo*

IL-8 è stata individuata in tessuti infiammati e fluidi biologici in corso di molte malattie. Queste includono lesioni cutanee nella psoriasi (Schroder e Christophers, 1986), fluidi sinoviali nell'artrite reumatoide (Brennan *et al.*, 1990), osteoartrite (Symons *et al.*, 1992) e artrite gottosa (Terkeltaub *et al.*, 1991).

Elevati livelli di IL-8 sono stati rilevati anche in altri liquidi biologici come il fluido derivante da lavaggio bronco (BAL) (Carre *et al.*, 1991), fluido pleurico (Broaddus *et al.*, 1992) e nelle urine (Ko *et al.*, 1993).

Sono state riportate correlazioni significative tra i livelli di IL-8 e infiltrazione dei neutrofili in corso di malattie.

IL-8 è un fattore essenziale per l'infiammazione acuta. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che l'IL-8 è importante anche per reazioni non infiammatorie. Nei topi, un omologo funzionale dell'IL-8, il MIP-2, induce la migrazione dei neutrofili in vagina dipendentemente dalla fase del ciclo sessuale (Sonoda *et al.*, 1998). Inoltre, la somministrazione sistemica di IL-8 induce rapidamente anche la migrazione di cellule staminali ematopoietiche dal midollo osseo al sangue periferico (Laterveer *et al.*, 1995). Questi risultati suggeriscono che IL-8 disciplina anche risposte fisiologiche non infiammatorie *in vivo*.

IL-8 induce anche l'infiltrazione di linfociti T nel tessuto infiammato. La continua iniezione di IL-8 causa una massiccia migrazione dei linfociti T nelle articolazioni (Kudo *et al.*, 1991). In una reazione di ipersensibilità di tipo ritardato modello, anticorpi monoclonali anti-IL-8 si sono mostrati ridurre l'infiltrazione di neutrofili e linfociti (Larsen *et al.*, 1995).

Questi risultati suggeriscono che IL-8 ha anche un ruolo significativo nel regolare in maniera diretta o indiretta la migrazione dei linfociti T e le reazioni infiammatorie.

La delezione di geni codificanti per recettori IL 8 quali CXCR2 nei topi mostrano un'inibizione nell'infiltrazione di neutrofili nel tessuto infiammato, anche se la funzione neutrofilica rimane conservata (Cacalano *et al.*, 1994).

Questo fenotipo è simile al blocco di IL-8 utilizzando all'attività esercitata da anticorpi anti-IL-8.

Tuttavia, altri topi knockout per geni coinvolti nell'azione di chemiotassi neutrofilica quale il recettore del complemento 5a (Hopken *et al.*, 1996) e la 5-lipossigenasi (Goulet *et al.*, 1994) non hanno mostrato alcuna riduzione dell'afflusso di neutrofili nei siti di infiammazione.

Questi dati suggeriscono come questi classici fattori chemotattici non sono importanti per l'infiltrazione di neutrofili in siti di flogosi mentre IL-8 che è essenziale per tale azione.

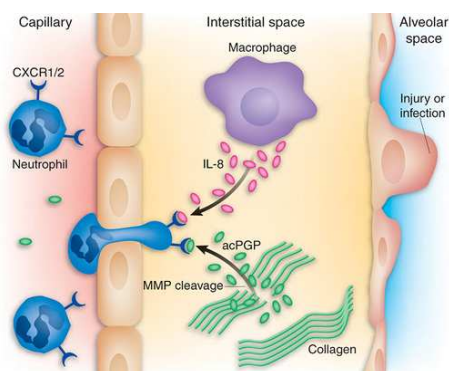


Fig 2.9
Effetto chemiotattico rivestito da IL 8

Topi transfettati per over esprimere IL-8 mostrano un eccessivo accumulo di neutrofili nella microcircolazione di polmone, fegato, milza senza infiltrazione dei neutrofili in nessun tessuto, essudazione plasmatica o danni tissutali apparenti (Simonet *et al.*, 1994).

L'espressione di L-selectina scende sulla superficie dei neutrofili circolanti in tali topi IL-8 transgenici, mentre quella dei neutrofili del midollo osseo e dei precursori dei neutrofili si manteneva nei range di normalità.

Inoltre, in questi topi transgenici è stata osservata una *up-regulation* non significativa delle integrine nei neutrofili del sangue periferico. Questi risultati indicano che IL-8 modula l'espressione di L-selectina di superficie, senza mostrare alcun effetto sul livello di integrina.

L'attività biologica *in vitro* di IL-8 e l'aumento nella produzione di IL-8 in corso di malattie infiammatorie ha indotto gli scienziati a somministrare specifici anticorpi monoclonali (mAbs) contro IL-8 in modelli di malattie infiammatorie acute animali in modo da stabilire il ruolo fisiopatologico dell'IL-8 *in vivo* (Tabella 2.1).

Nel coniglio il modello di lesioni polmonari da riperfusione, la somministrazione di mAb contro IL-8 riduce drasticamente i danni inibendo l'infiltrazione dei neutrofili nel tessuto polmonare, nonostante la presenza di altre sostanze ad azione chemoattrattiva verso i neutrofili quali le componenti del complemento (Sekido *et al.*, 1993).

Inoltre, il trattamento con anticorpi monoclonali anti-IL-8 ha bloccato l'infiltrazione di neutrofili nel tessuto infiammato e impedito le lesioni dei tessuti in molti altri modelli animali quali la dermatite LPS-indotta (Harada *et al.*, 1993), la glomerulonefrite acuta sperimentalmente indotta (Wada *et al.*, 1994), l'acido-aspirazione indotta da sindrome da stress respiratorio acuto (ARDS) (Folkesson *et al.*, 1995) e il danno da ischemia cerebrale riperfusiva (Matsumoto *et al.*, 1997).

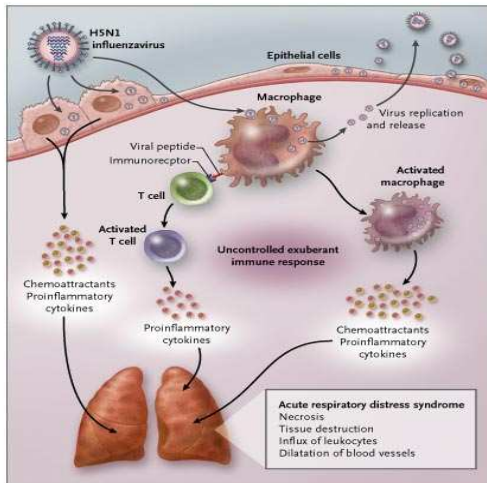


Figura 2.10
Schematizzazione della cascata di eventi determinati in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS).

Terapia

L'uso di anticorpi monoclonali verso IL-8 è stato sperimentato clinicamente da parecchie aziende; tale anticorpo è completamente di derivazione umana ma ricavato da un topo transgenico in cui l'anticorpo murino è stato sostituito dal gene dell'anticorpo umano. Più avanti si prevede di testare pazienti affetti da artrite reumatoide.

Sono stati inoltre sviluppati antagonisti di sintesi per i recettori dell'IL-8. Lo sviluppo clinico di tali antagonisti per IL-8 incoraggerà lo sviluppo di farmaci da utilizzarsi in diverse altre malattie infiammatorie e immunitarie in medicina umana utilizzando l'IL-8 come prototipo per gli altri membri della famiglia delle citochine chemiotattiche.

Tabella 2.1 Patologie con elevate espressioni di IL-8

Fluidi biologici	Patologie
Liquido di lavaggio bronco alveolare (BAL)	Sindrome acuta da stress respiratorio (ARDS)
	Fibrosi idiopatica polmonare
	Edema polmonare (danno da ri-perfusione)
Fluido pleurale	Empiema
Urine	Infezione del tratto urinario (UTI)
	Nefropatia derivante da IgA
	Glomerulonefrite acuta (AGN)
	Purpuric nephritis
	Glomerulonefrite membranosa proliferativa (MGPN)
Fluido sinoviale	Artrite reumatoide
	Osteoartrite

Interleuchina 10 (IL 10)

Introduzione

Interleuchina 10 (IL-10) è una citochina prodotta da monociti e linfociti T attivati fortemente coinvolta nella regolazione della risposta infiammatoria e nelle reazioni immunitarie.

La sua principale funzione è definita dall'appellativo "ammortizzatore delle risposte immunitarie", ma l'IL-10 possiede anche molte attività stimolatrici.

IL-10 è una citochina pleiotropica e per questo la ricerca delle molteplici funzioni svolte e dei meccanismi di azione che la vedono coinvolta è ancora molto attiva.

Essa riguarda non solo il sistema immunitario, ma attraverso la modulazione di fattori di crescita, citochine e altri mediatori, può influenzare molti processi fisiologici, quali ad esempio l'angiogenesi, i tumori e le infezioni.

Si tratta di una molecola chiave in grado di migliorare l'evoluzione dei processi patologici autoimmuni attraverso l'inibizione di molti aspetti della risposta infiammatoria.

In aggiunta, l'induzione in linfociti T regolatori di IL-10 le attribuisce un ruolo cardine nell'instaurarsi di una tolleranza. Tutte queste caratteristiche fanno dell'IL-10 una candidata auspicabile per l'utilizzo in studi clinici in diverse malattie infiammatorie croniche o malattie autoimmuni.

Struttura genica e proteica

Il gene codificante per l' IL-10 pesa 4.7 kb ed è costituito da 5 esoni separati da 4 introni.

Un elemento di risposta glucocorticoide (GRE) e un elemento di risposta all'AMP ciclico (CRE) si riscontrano fra i fattori di regolazione trascrizionali. Il CRE sembra essere funzionale quali agente in grado di aumentare i livelli intracellulari cAMP migliorando l'espressione di IL-10 in monociti. Da rilevare inoltre che l'espressione del gene IL-10 nei monociti non dipende dall'attivazione del NF κB (Bondeson *et al.*, 1999).

Sono stati osservati diversi polimorfismi nel gene dell'IL-10 (Eskdale *et al.*, 1997a). Questi polimorfismi sono stati legati a una maggiore produzione di IL-10 da parte di monociti e linfociti T e sono implicati nei livelli di produzione di IL-10 da parte di pazienti affetti o suscettibili di lupus eritematoso sistemico (LES), artrite reumatoide (RA), malattia da meningococco (Eskdale *et al.*, 1997b; Westendorp *et al.*, 1997; Mehrian *et al.*, 1998; Crawley *et al.*, 1999) e può essere prognostico del rigetto in seguito a trapianto renale (Sankaran *et al.*, 1999).

Il gene per IL-10 umana codifica per una proteina di 178 aminoacidi, che comprende una sequenza di segnale idrofobica composta da 18 aminoacidi.

Il predetto peso molecolare dell'IL-10 è di circa 19 kDa e si svolge come una variante unica con un peso molecolare apparente di 17 kDa su SDS-PAGE (Vieira *et al.*, 1991); all'interno contiene quattro residui di cisteina che formano due legami disolfuro intramolecolare, Cys12 si accoppia a Cys108 e Cys62 a Cys114 (Windsor *et al.*, 1993). Il punto isoelettrico (pI) di IL-10 è 7,9. IL-10 umana è sensibile all'esposizione a un pH inferiore a 5,5 che si tradurrà in materiale biologicamente inattivo.

Strutturalmente, IL-10 appartiene alla famiglia delle citochine a lunga catena caratterizzata da un pacchetto di quattro α eliche (Sprang e Bazan, 1993). IL-10 è un dimero composto da un identiche catene polipeptidiche collegate da un asse 2 volte formando una struttura a forma di

V. Ogni metà del dimero consiste di sei eliche α , quattro provenienti da una subunità e due dall'altra. La topologia delle eliche assomigliano ad IFN γ (Zdanov *et al.*, 1996).

Omologhi dell'IL-10 di origine virale sono stati trovati in genomi di Epstein-Barr Virus (EBV), *Herpesvirus equino di tipo 2* (EHV2), e *poxvirus Orf* (Moore *et al.*, 1990; Rode *et al.*, 1993; Fleming *et al.*, 1997).

Fonti cellulari ed espressione tissutale

IL-10 è espresso da linfociti T naive e di memoria derivati da sangue periferico o dal cordone ombelicale, linfociti T appartenenti alla sottofamiglia Th1 e Th2, e sottoinsiemi Tr1, linfociti NK, linfociti B derivati da sangue periferico, tonsille o la milza, linee di linfociti B Epstein-Barr Virus (EBV)-trasformate, linfomi AIDS correlati, monociti (Chabot *et al.*, 1999), trofoblasti placentari, cellule dell'epitelio bronchiali e da alcune cellule tumorali comprese melanomi e carcinomi di diversa provenienza (de Waal Malefyt *et al.*, 1998).

L'attivazione è generalmente richiesta per l'espressione in cellule non trasformate di origine ematopoietica. IL-10 è prodotta da cellule dendritiche derivate da placche del Peyer, ma non da cellule dendritiche derivate da milza (Iwasaki *et al.*, 1999).

Numerosi agenti di natura endogena ed esogena sono in grado di modulare l'espressione di IL 10.

La produzione di IL-10 da parte di linfociti T può essere indotta da IL-12, IL-4, IFN α e l'IL-10 stessa può indurre una popolazione di linfociti T regolatori a produrre alti livelli di citochina in seguito ad attivazione antigene specifica.

LFA-1/ICAM-1 sono i segnali di costimolazione più potenti nell'induzione di IL-10 in seguito ad attivazione con anti-CD3 piuttosto che ad una costimolazione con ICAM-2 o ICAM-3 (Bleijs *et al.*, 1999). La ciclosporina inibisce la produzione di IL-10 da parte dei linfociti T, ma, paradossalmente, è in grado di migliorare la produzione di IL-10 da parte dei monociti.

La produzione di IL-10 in seguito a stimolo con LPS da parte dei monociti è favorito dalla presenza di TNF α e dagli agenti che aumentano i livelli intracellulari di cAMP come l'ormone melanocita-stimolante, le prostaglandine E2, l'adenosina, catecolamine e clorpromazina, l'istamina (Elenkov *et al.*, 1998), peptide vasointestinale (VIP) (Delgado *et al.*, 1999).

La produzione di IL 10 al contrario è inibita da IL-4, IL-10 stessa, IL-13, IFN γ e TGF β .

L'inibizione di IL-10 ad opera di IL-4 nei monociti dipende dall'espressione della catena comune γ (Bonder *et al.*, 1999). Inoltre la produzione di IL-10 da parte dei monociti indotta da LPS dipende da TNF α e IL-1 endogeni (Foey *et al.*, 1998).

Il rilascio di IL-10 da monociti indotta da catecolamine conseguente a lesioni cerebrali può rappresentare una modalità per indurre un'immunodepressione (Woiciechowsky *et al.*, 1998). La produzione di IL-10 da monociti è relativamente insensibile ai glucocorticoidi (Visser *et al.*, 1998). Il citomegalovirus murino induce l'espressione di IL-10 in macrofagi (Redpath *et al.*, 1999). La produzione di IL-10 conseguente ad irradiazione con raggi UV di cheratinociti può essere dipendente dalla produzione di IL-6 da parte di cellule del Langherans (Nishimura *et al.*, 1999).

Il dimero dell'IL 10 interagisce con 2 recettori eterodimerici complessi costituiti dal recettore per IL10R α e dalla subunità dell'IL 10R β .

Attività *in vitro*

IL-10 modula in maniera significativa l'espressione di citochine e delle molecole di superficie in cellule di origine mieloide. Questi cambiamenti hanno conseguenze importanti per le funzioni di queste cellule nell'attivare o regolare le risposte infiammatorie del sistema immunitario.

IL-10 inibisce fortemente la produzione di IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 stessa, IL-12, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF α , MIP-1, MIP-2, RANTES e LIF da parte di monociti / macrofagi attivati (de Waal Malefyt *et al.*, 1993a; Fiorentino *et al.*, 1991a; D'Andrea *et al.*, 1993; Gruber *et al.*, 1994; Berkman *et al.*, 1995; Marfaing-Koka *et al.*, 1996). L'inibizione della produzione di alcune citochine, come KC, risulta da una destabilizzazione dell'mRNA mediata da tratti ricchi di elementi AU nella regione non codificante 3' di geni sensibili (Kim *et al.*, 1998; Kishore *et al.*, 1999).

Sono anche descritti meccanismi alternativi di produzione per IL 10 come l'inibizione di IL-12 che si verifica a livello di trascrizione e dipende dalla sintesi di nuove proteine (Aste-Amezaga *et al.*, 1998) e l'inibizione della produzione del TNF α che si verifica attraverso meccanismi presenti a livello trascrizionale e post trascrizionale, ma che è indipendente dalla capacità di IL-10 di inibire l'attivazione di NF κ B (Clarke *et al.*, 1998).

IL-10 induce e rafforza l'espressione di citochine ad azione chemiotattica per monociti (Hedrick *et al.*, 1998) e aumenta l'espressione di CCR5 (Sozzani *et al.*, 1998). Inoltre, IL-10 aumenta la produzione di IL-1Ra (Cassatella *et al.*, 1994; de Waal Malefyt *et al.*, 1991a; Jenkins *et al.*, 1994) e l'espressione di recettori solubili per il TNF α (TNF α R) p55 e p75 (Dickensheets *et al.*, 1997), il che indica come IL-10 induca il passaggio dalla produzione di mediatori proinfiammatori ad anti-infiammatori.

IL-10 inibisce anche l'espressione di antigeni MHC di classe II, CD54 (detto anche ICAM 1), CD80, e CD86 su monociti, anche a seguito di induzione di queste molecole mediante IL-4 o IFN γ (de Waal Malefyt *et al.*, 1991b; Ding *et al.*, 1993; Kubin *et al.*, 1994; Willems *et al.*, 1994).

La *downregulation* di queste molecole stimolatorie o costimolatorie influenza significativamente la capacità delle cellule presentanti l'antigene nell'attivazione di linfociti T (de Waal Malefyt *et al.*, 1991b; Fiorentino *et al.*, 1991b; Ding e Shevach, 1992). IL-10 inibisce l'espressione di MHC di classe II in monociti attraverso un meccanismo di inibizione posttrascrizionale che coinvolge il trasporto di molecole MHC di classe II mature presentanti il peptide verso la membrana plasmatica (Koppelman *et al.*, 1997).

In contrasto, IL-10 aumenta l'espressione di FcR sui monociti, tra cui CD16 e CD64 (te Velde *et al.*, 1992; de Waal Malefyt *et al.*, 1993a; Calzada-Wack *et al.*, 1996), ma downregola l'espressione di CD23 indotta da IL-4 (Morinobu *et al.*, 1996).

La *up regulation* di CD64 correla con una maggiore citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (Velde *et al.*, 1992) mentre verso i tumori vi è una citotossicità inibita dall'IL-10 (Nabioullin *et al.*, 1994).

Una *up regulation* di FcR determinata dall'IL-10 rafforza la capacità di monociti / macrofagi nel fagocitare particelle opsonizzate, batteri e funghi (Capsoni *et al.*, 1995; Spittler *et al.*, 1995), ma riduce la capacità delle cellule di uccidere gli organismi fagocitati diminuendo la generazione di anioni superossido (O₂⁻) e di ossido di azoto (NO) (Gazzinelli *et al.*, 1992; Niuro *et al.*, 1995; Cenci *et al.*, 1993; Roilides *et al.*, 1997).

Gli effetti inibitori di IL-10 sulla produzione di NO in macrofagi può verificarsi per un meccanismo indiretto che coinvolge l'inibizione della sintesi di citochine (Oswald *et al.*, 1992a, 1992b; Flesch *et al.*, 1994).

IL-10 inibisce la produzione di prostaglandina E2, un altro mediatore proinfiammatorio (Niuro *et al.*, 1994) e la capacità dei monociti/macrofagi di modulare il *turnover* di matrice extracellulare attraverso effetti inibitori sulla produzione di collagenasi e gelatinasi (Lacraz *et al.*, 1995; Mertz *et al.*, 1994).

IL-10 rafforza l'espressione del recettore PAF sui monociti, rendendo tali cellule più sensibili ai fattori chemiotattici (Thivierge *et al.*, 1999).

IL-10 inibisce anche l'espressione in monociti del fattore tissutale proteina C-reattiva (CRP)-indotta e LPS-indotta, ma non di quello CD 40-indotta (**fig 2.8**) che determina una riduzione dell'attività procoagulante (Jungi *et al.*, 1994; Pradier *et al.*, 1996; Ramani *et al.*, 1994).

Gli effetti di IL-10 sulla produzione di citochine e sulla funzione dei macrofagi sono generalmente simili a quelli sui monociti, anche se un po' meno accentuati (Zissel *et al.*, 1996).

Inoltre, IL-10 inibisce la produzione di IL-12 e l'espressione di molecole di costimolazione su vari tipi di cellule dendritiche (Ludewig *et al.*, 1995; Mitra *et al.*, 1995), il che è correlato alla sua capacità di inibire la risposta primaria alloantigene-specifica dei linfociti T (Bejarano *et al.*, 1992; Caux *et al.*, 1994).

Inoltre il trattamento di cellule dendritiche con IL-10 può indurre uno stato di anergia in linfociti T attivati da alloantigeni da antigeni peptidici (Steinbrink *et al.*, 1997). IL-10 inibisce anche la generazione di cellule dendritiche monociti-derivati in coltura con GM-CSF e IL-4 (Allavena *et al.*, 1998) e induce l'apoptosi di cellule dendritiche plasmacitoidi (DC2) (Rissoan *et al.*, 1999).

Anche le funzioni della componente granulocitaria sono influenzate dall'IL-10. La produzione di citochine e chemochine LPS-indotte, la generazione di anioni superossido e la sopravvivenza di polimorfonucleati vengono inibiti dall'IL-10, mentre la produzione di IL-1Ra viene potenziata (Cassatella *et al.*, 1997; Chaves *et al.*, 1996; Marie *et al.*, 1996).

IL-10 inibisce anche la sopravvivenza LPS-indotta e la produzione di citochine da parte degli eosinofili (Takanaski *et al.*, 1994). IL-10 riduce la migrazione dei neutrofili in lesioni polmonari indotte da complessi IgG o in flogosi polmonare indotta da LPS o antigeni (Shanley *et al.*, 1995; Zuany-Amorim, *et al.*, 1995; Cox, 1996), evento che può essere correlato alla sua capacità di regolare l'espressione delle chemochine.

D'altro canto, la neutralizzazione di IL-10 ha portato ad una maggiore sopravvivenza di batteri quali *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium avium* in modelli murini, in quanto la capacità microbicida verso batteri fagocitati viene ad essere in parte soppressa da parte di IL-10 endogena (Greenberger *et al.*, 1995; van der Poll *et al.*, 1996b). L'inibizione attraverso IL-10 della produzione di chemochine e di altri mediatori coinvolti nella sopravvivenza dei granulociti non fa che limitare la durata di una risposta infiammatoria, dal momento che questi agenti la mantengono.

IL-10 è un cofattore per la proliferazione di mastociti mucosali indotta da IL-3- o IL-4 (Rennick *et al.*, 1995). Inoltre induce l'espressione di due specifiche proteasi sulla superficie mastocitaria quali MCP-1 e MCP-2 (Ghildyal *et al.*, 1992a, 1992b, 1993). Queste attività dell'IL-10 possono contribuire in corso di risposte immunitarie verso infestazioni da elminti (Behnke *et al.*, 1993). IL-10 ha anche un effetto inibitorio in merito alla produzione di TNF α e GM-CSF in mastociti in seguito all'attivazione del recettore IgE ad alta affinità (Arock *et al.*, 1996). Tuttavia, la stessa attivazione induce una prolungata espressione di ciclo ossigenasi (COX-2), che si traduce in aumento di produzione delle prostaglandine D2 (Ashraf *et al.*, 1996).

Tale citochina induce una maggiore espressione di MHC di classe II e la sopravvivenza di linfociti B murini (Go *et al.*, 1990). In contrasto, IL-10 inibisce la motilità e la produzione di anticorpi IL-5-indotta contro antigeni timo-indipendente di tipo I e II ma non contro gli antigeni timo-dipendente. Tale inibizione è sovvertita in caso di somministrazione di IL-4 (Clinchy *et*

al., 1994; Pecanha *et al.*, 1992, 1993). Inoltre, i linfociti B non sembrano svolgere un ruolo nella malattia infiammatoria intestinale che si sviluppa in animali knock out per IL 10 (Davidson *et al.*, 1996).

Una maggior attività da parte dell'IL-10 è stata descritta in linfociti B umani. IL-10 favorisce la sopravvivenza dei precursori di linfociti B normali umani a seconda del loro stato di attivazione, in correlazione con la maggiore espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Levy e Brouet, 1994; Itoh e Hirohata, 1995).

IL-10 favorisce la proliferazione dei precursori dei linfociti B umani verso forme mature in presenza di anticorpi monoclonali anti-IgM, di *Stafilococcus aureus* o il crosslinking di CD40 (Rousset *et al.*, 1992; Saeland *et al.*, 1993).

IL-2 e IL-4 potenziano ulteriormente la proliferazione dei linfociti B attivati da IL-10 mediante anticorpi anti-CD40. Gli effetti sinergici esercitati dall'IL-2 correlano con una maggior espressione indotta dall'IL-10 di recettori ad alta affinità per IL-2 su linfociti B (Fluckiger *et al.*, 1993).

L'IL-10 di origine esogena e derivante da linfociti B è coinvolta nella differenziazione dei linfociti B stessi e nello *switch* isotipico (Burdin *et al.*, 1995). Linfociti B attivati da anticorpi anti-CD40 possono produrre, in presenza di IL-10, una grande quantità di IgM, IgG1-3, IgA mentre producono IgG4 e IgE se posti in compresenza di IL-10 e IL-4 (Garrone *et al.*, 1994; Punnonen *et al.*, 1993; Rousset *et al.*, 1992; Uejima *et al.*, 1996).

Inoltre, la stimolazione tramite anti-CD40 e IL-10 dei linfociti B induce un cambio di produzione dall'isotipo IgG1 a isotipi IgG3 (Malisan *et al.*, 1996) e, in combinazione con TGF β , ad IgA (Defrance *et al.*, 1992).

E' stata osservata una produzione di IgA IL-10-indotta da parte di linfociti B attivati da anticorpi anti-CD40 in pazienti affetti da deficit di IgA, anche se in questi pazienti non si evidenziava un difetto nella produzione di IL-10 (Briere *et al.*, 1994a). La coltura di linfociti B stimolato da anticorpi anti-CD40 o da linfociti T attivate esprimendo il ligando CD40 in presenza di IL-10 ha determinato la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule (Merville *et al.*, 1995; Rousset *et al.*, 1995).

Tali effetti di IL-10 potrebbero giocare un ruolo nella patogenesi del lupus eritematoso sistemico (LES), dove sono state rilevate correlazioni positive fra livelli sierici di IL-10 e gravità della malattia, e tra la produzione di IL-10 e la quantità di autoanticorpi da parte di linfociti B (al-Janadi *et al.*, 1996; Hagiwara *et al.*, 1996; Houssiau *et al.*, 1995; Llorente *et al.*, 1994, 1995).

Un ruolo di IL-10 nello sviluppo di LES è stato suggerito dalla ritardata comparsa di autoimmunità in topi predisposti a LES trattati con anticorpi contro tale citochina (Ishida *et al.*, 1994). Questi risultati hanno suggerito che gli antagonisti dell'IL-10 potrebbero essere utili nella terapia del LES.

IL-10 inibisce fortemente la produzione di citochine e la proliferazione dei linfociti T e dei cloni linfocitari T attivati in presenza di APCs.

Questo effetto dell'IL-10 è dovuto in gran parte all'effetto di *downregulation* sulle funzioni delle APC (de Waal Malefyt *et al.*, 1991b; Fiorentino *et al.*, 1991b; de Waal Malefyt *et de Vries*, 1996).

Ciò è determinato dal fatto che i linfociti T esprimono il recettore IL-10R (Liu *et al.*, 1997) per cui IL-10 modula la funzione dei linfociti T.

L'IL-10 inibisce la produzione di IL-2 e TNF α , ma non di IL-4 e IFN γ quando linfociti T sono stimolati in assenza di APCs (de Waal Malefyt *et al.*, 1993b; Taga et Tosato, 1992).

Curiosamente, l'attivazione dei linfociti T in presenza di IL-10 può indurre uno stato di anergia di lunga durata, che non può essere annullata dall'IL-2 o dalla stimolazione mediante anti-CD3 e anti-CD28 (Groux *et al.*, 1996).

Un ruolo di IL-10 nell'induzione e mantenimento dell'assenza di risposta/anergia è stato suggerito da studi in linfociti in ambito di risposte antitumorali, tolleranza UV-indotta, tolleranza aptene-specifica, parassitosi, infezioni da HIV e risposte iporeattive superantigene-indotte (Flores *et al.*, 1993 ; Enk *et al.*, 1993, 1994; Becker *et al.*, 1994; Flores Villanueva *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995; King *et al.*, 1996; Schols e De Clercq, 1996; Sundstedt *et al.* , 1997) e può essere indotta da immunoterapia specifica (Akdis *et al.*, 1998) o da una continua stimolazione antigenica *in vivo* (Buer *et al.*, 1998).

IL-10 inibisce l'apoptosi di linfociti normali o infetti da mononucleosi conseguente alla degradazione del fattore di crescita che correla con la *up regulation* di Bcl-2 e svolge attività chemotattica sui linfociti T CD8 +.

Inoltre, IL-10 induce la proliferazione dei linfociti T CD8 + (Groux *et al.*, 1998; Rowbottom *et al.*, 1999). L'attività stimolatoria di IL-10 su linfociti T è stata descritta anche nel topo dove IL 10 agisce come un fattore di crescita dei timociti e aumenta l'espressione di precursori dei linfociti T citotossici (MacNeil *et al.*, 1990; Chen e Zlotnik, 1991).

IL-10, direttamente o indirettamente, svolge la funzione su linfociti NK in svariate modalità.

IL-10 inibisce in monociti la produzione di IFN γ determinata da IL-2 e la produzione di TNF α in linfociti NK. Questo effetto è indiretto e mediato attraverso l'inibizione della produzione di monochine quali IL-1 e IL-12 (D'Andrea *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 1992). L'inibizione da parte dell'IL-10 nella produzione di IFN γ in topi in seguito a infezioni da parassiti intracellulari avviene attraverso meccanismi analoghi (Tripp *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1994; Cardillo *et al.*, 1996). IL-10 inibisce anche la produzione di IL-5 in cloni di linfociti NK umani stimolati da linfociti tumorali e IL-2 (Warren *et al.*, 1995).

Studi hanno rivelato un ruolo dell'IL-10 anche in linfociti NK in corso di risposte antitumorali.

A basse concentrazioni, l'inibizione esercitata da IL-10 verso il tumore in metastasi sperimentali o modelli spontanei correlava con la localizzazione di un numero elevato di linfociti NK nel sito neoplastico.

Attività *in vivo*

I topi KO per IL-10 hanno mostrato un aspetto normale alla nascita, così come normali numeri e distribuzione di linfociti T, linfociti B e macrofagi. Tuttavia, questi topi diventano anemici e deperiti dopo 4-6 settimane a causa di enterocoliti sviluppatesi spontaneamente (Kuhn *et al.*, 1993), con la comparsa di adenocarcinomi a stadi avanzati (Berg *et al.*, 1996). Le enterocoliti potrebbero essere prevenute con la somministrazione di IL-10 dalla nascita e da un trattamento con anticorpi monoclonali anti-IFN γ o anti-IL-12. IL-10 migliora ma non è in grado di curare completamente lo stabilirsi malattia. Linfociti CD4 + T isolati dal colon malato producono elevati livelli di TNF α e IFN γ e sono in grado di trasferire la malattia, il che indica che la interazione alterata tra la flora enterica e cellule infiammatorie, in assenza di IL-10, porta ad una incontrollata risposta Th1 (Davidson *et al.*, 1996).

Sono stati prodotti quattro tipi di topi transgenici per IL-10, dove l'espressione è guidata dal promotore di IL-2, il promotore MHC di classe II, il promotore delle amilasi salivari umane e il promotore dell'insulina murina. L'espressione di IL-10 stimolata da promotori specifici associati alle isole pancreatiche accelera lo sviluppo del diabete insulino-dipendente mellito (IDDM) in topi transgenici NOD (Wogensen *et al.*, 1993, 1994; Lee *et al.*, 1994, 1996; Moritani *et al.*, 1994, 1996; Balasa e Sarvetnick, 1996; Mueller *et al.*, 1996). Alti livelli di espressione dell'IL-10 localizzati alle isole pancreatiche, rispetto alla somministrazione sistemica o alla produzione in diverso sito, possono attivare l'endotelio e promuovere la chemoattrazione di linfociti e/o cellule mieloidi, predisponendo quindi il topo allo sviluppo della malattia. Al contrario, i topi transgenici che esprimono IL-10 sotto il controllo del promotore di IL-2 (Hagenbaugh *et al.*, 1997) non diventano diabetici.

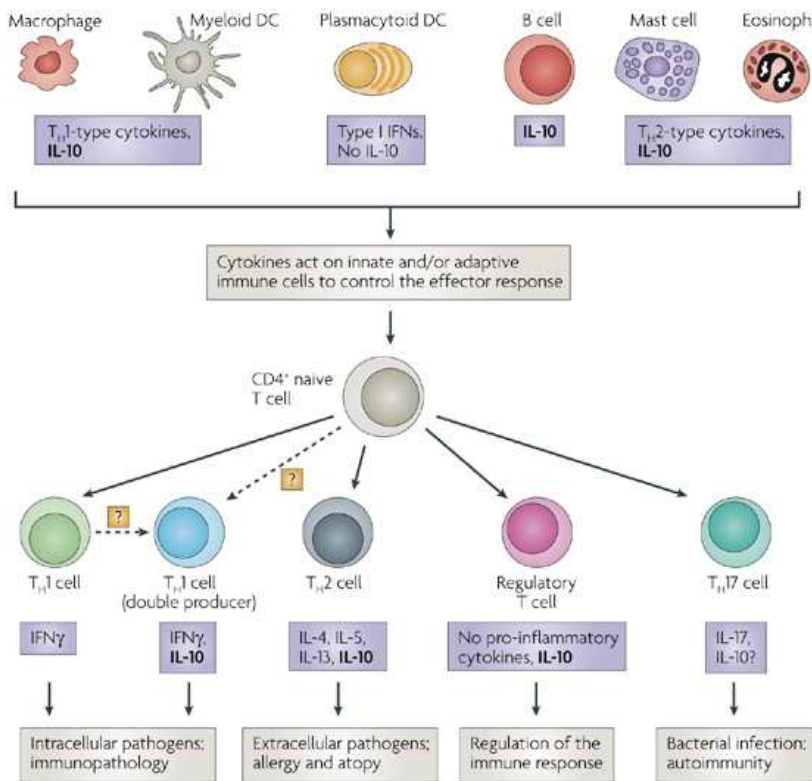


Fig. 2.11 Azioni svolte su diverse tipologie cellulari dall'Interleuchina 10 (IL 10).

L'espressione di IL-10 da parte del promotore MHC di classe II ha determinato effetti inibitori sulla generazione di risposte da parte di linfociti T alle proteine antigeniche ma ha rafforzato le risposte dei linfociti CTL agli antigeni tumorali, in accordo con gli effetti stimolatori di IL-10 sui linfociti CD8 +.

D'altra parte, questi topi transgenici sono stati molto sensibili al contagio con agenti patogeni intracellulari, confermando gli effetti inibitori di IL-10 sulla uccisione NO-dipendente dei macrofagi (Groux *et al.*, 1999) e hanno mostrato difetti nello sviluppo dei linfociti T (Rouleau *et al.*, 1999). L'espressione transgenica di IL-10 nelle ghiandole salivari ha indotto l'apoptosi del tessuto ghiandolare, la distruzione e l'infiltrazione linfocitaria costituita principalmente da linfociti T CD4+ ligando Fas+ (FasL), così come una *up regulation in vitro* dell'espressione di FasL su linfociti T, il che indica che Fas/FasL svolge un ruolo nello sviluppo della malattia (Saito *et al.*, 1999).

Terapia

Gli effetti di IL-10 per i singoli tipi di cellule suggerisce come essa sia dotata di potenti attività antiinfiammatorie e soppressive *in vivo*, testato in una varietà di modelli sperimentali.

IL-10 ha ridotto i livelli sierici di TNF α , IL-6, IL-8 così come l'accumulo di neutrofili, la produzione di elastasi e livelli di cortisone in volontari umani ai quali era stata iniettata con una bassa dose di endotossina (Pajkrt *et al.*, 1997).

La somministrazione di endotossina induce la produzione di IL-10 in topi, scimpanzé, babbuini, e l'uomo (Durez *et al.*, 1993; van der Poll *et al.*, 1994; Jansen *et al.*, 1996; Pajkrt *et al.*, 1997). Curiosamente, IL-10 LPS-indotta da parte di espressione *in vitro* di monociti ritardo si verifica dopo l'attivazione (de Waal Malefyt, 1991a), ma IL-10 *in vivo*, i livelli sierici erano già elevati 3-6 ore dopo somministrazione di endotossina (Durez *et al.*, 1993 ; Van der Poll *et al.*, 1994; Jansen *et al.*, 1996; Pajkrt *et al.*, 1997), il che indica che le cellule o altri fattori possono contribuire alla produzione di IL-10 in queste circostanze.

IL-10 endogena conferisce una protezione contro la somministrazione di endotossine riducendo la produzione di TNF α , IFN, e MIP-2 (Marchant *et al.*, 1994a; Standiford *et al.*, 1995). Questo è osservato chiaramente anche nei topi trattati dalla nascita con anticorpi monoclonali anti-IL-10 e topi KO per IL-10, che sono uccisi da dosi 20 volte più basse di LPS (Ishida *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1995a).

Inoltre, topi knockout per IL 10 sono soggetti estremamente vulnerabili ad una reazione generalizzata di Swartzman dove ad una prima esposizione a piccole quantità di LPS segue una successiva risposta letale a dosi ritenute normalmente altrimenti subletali (Berg *et al.*, 1995a).

IL-10 protegge anche topi neonati dalla letale infezione da streptococco B (Cusumano *et al.*, 1996). Inoltre, IL-10 endogeno impedisce la letalità SEB-indotta da shock, che dipende dalla produzione di IL-2 e IFN γ in linfociti T (Florquin *et al.*, 1994).

Negli esseri umani, l'IL-10 è prodotta durante la setticemia e lo shock settico e livelli sierici correlano con l'intensità della risposta infiammatoria (Marchant *et al.*, 1994b, 1995; Gomez-Jimenez *et al.*, 1995; Sherry *et al.*, 1996; van Sondaggio *et al.*, 1997), fatto particolarmente evidente nei pazienti affetti da shock settico associato a infezioni da meningococco (Frei *et al.*, 1993; Derkx *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 1995; van Furth *et al.*, 1995).

Gli effetti inibitori di IL-10 sulla produzione di citochine proinfiammatorie endotossina-indotta, comprende gli effetti indiretti sulla attivazione delle cellule endoteliali e loro adesione (Pugin *et al.*, 1993; Eissner *et al.*, 1996), l'espressione del fattore tissutale dei monociti (che contribuisce alla coagulazione intravasale disseminata (CID)) (Pradier *et al.*, 1996; Ramani *et al.*, 1994; Jungi *et al.*, 1994), così come l'osservazione che molte arrività in corso di sepsi influenzano la

produzione di IL-10 (Bourrie *et al.*, 1995; Suberville *et al.*, 1996; van der Poll *et al.*, 1996a), indicano un ruolo importante dell'IL 10 nel controllo di risposte infiammatorie sistemiche.

IL-10 inibisce le fasi di sensibilizzazione e induzione nelle risposte di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH) (Li *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1994). IL-10 agisce in sinergia con IL-4 per inibire le reazioni tipo DTH determinate dalla tubercolina in topi Balb/C che avevano superato una grave infezione da leishmaniosi (Powrie *et al.*, 1993b).

E' stato descritta un possibile ruolo benefico per IL-10 nella patogenesi della artrite reumatoide (AR). La produzione di IL-10 è stata dimostrata in sieri, liquido sinoviale ed espianti sinoviali in colture da pazienti affetti da AR (Katsikis *et al.*, 1994; Llorente *et al.*, 1994; Cush *et al.*, 1995; al-Janadi *et al.*, 1996 ; Bucht *et al.*, 1996). IL-10 ha inibito la produzione di TNF α , IL-1, IL-8 da parte di macrofagi sinoviali e sinoviociti (Deleuran *et al.*, 1994; Chomarat *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 1995), e sono stati osservati effetti sinergici in combinazione con IL-4 (Sugiyama *et al.*, 1995).

La produzione di citochine da parte di cellule sinoviali veniva in parte soppressa dall'IL-10 endogena indicando che IL-10 *in vivo* può avere un ruolo di protezione (Katsikis *et al.*, 1994). Cellule producenti IL-10 comprendono macrofagi sinoviali e linfociti T (Katsikis *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1995).

D'altro canto, la produzione di IL-10 in artrite reumatoide è stato associata ad un aumento della produzione di autoanticorpi, fattore di siero e attivazione dei linfociti B (Cush *et al.*, 1995; Perez *et al.*, 1995; al-Janadi *et al.*, 1996).

IL-10 è protettiva nei modelli animali di artrite reumatoide dal momento che essa riduce il gonfiore delle articolazioni, le infiltrazioni, la produzione di citochine, la degradazione cartilaginea in corso di artrite collagene-indotta e artrite indotta da parete cellulare di streptococco (Kasama *et al.*, 1995; Persson *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1996; van Roon *et al.*, 1996; Walmsley *et al.*, 1996; Apparailly *et al.*, 1998). IL-4 e IL-10 agiscono in modo sinergico nel ridurre l'infiammazione acuta e cronica nei modelli di artrite (Joosten *et al.*, 1997).

IL-10 è stato testato in modelli di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) modello murino per la sclerosi multipla nell'uomo.

La somministrazione sistemica di IL-10 durante la fase di avvio della malattia sopprime l'induzione della malattia e riduce la proliferazione dei linfociti T verso proteine basiche della mielina e l'infiltrazione del CNS (Rott *et al.*, 1994).

Inoltre, la neutralizzazione di IL-10 endogena aumenta l'incidenza e la gravità delle recidive in corso di SEB indotta da TNF α , il che suggerisce un ruolo di protezione per l'IL-10 nello sviluppo della malattia (Crisi *et al.*, 1995). Aumenti di livelli di mRNA codificante per IL-10 sono stati osservati in fase di recupero da EAE acuta nei topi e nei ratti (Kennedy *et al.*, 1992; Issazadeh *et al.*, 1995), e la mancanza di produzione di IL-10 è stata osservata in EAE cronica recidivante (Issazadeh *et al.*, 1996).

L'espressione IL-10 è stata rilevata nel liquido cefalo rachidiano di cellule mononucleate di pazienti con sclerosi multipla (Navikas *et al.*, 1995).

IFN, che è stato usato con successo per il trattamento di pazienti affetti da SM, induce espressione di IL-10 in PBMC di pazienti affetti da sclerosi multipla, il che indica che IL-10 potrebbe potenzialmente essere utile per il suo trattamento.

Un certo numero di malattie infettive sono caratterizzate da una mancanza di immunità cellulo-mediata. IL-10 contribuisce alla immunosoppressione osservata in corso di lebbra lepromatosa,

filariosi, leishmaniosi viscerale, toxoplasmosi, listeriosi, schistosomiasi, infezione da *Legionella pneumofila*, infezione da tripanosoma, malaria e HIV.

Il coinvolgimento in casi di infezione umana è rivelata in molti studi da una maggiore produzione di IL-10 da parte di PBMC prelevati dai pazienti e il ristabilirsi di risposte antigene-specifiche proliferative in PBMC dei pazienti dopo somministrazione in vitro di anticorpi monoclonali neutralizzanti anti-IL-10 (Sieling *et al.*, 1993 ; Peyron *et al.*, 1994; Carvalho, 1995; Mahanty e Nutman, 1995; Sieling e Modlin, 1995; King *et al.*, 1996; Mahanty *et al.*, 1996).

Il ruolo di IL-10 nei modelli animali di infezione è stato chiaramente stabilito. La neutralizzazione dell'IL-10 porta a una maggiore produzione antigene specifica di IFN in linfociti T CD4 + di topi infettati con *Leishmania major* o *Schistosoma mansoni*, e la somministrazione *in vivo* di anticorpi monoclonali anti-IL-10 può convertire rispettivamente ceppi sensibili in resistenti o vice versa (Sher *et al.*, 1991; Flores Powrie *et Coffman*, 1993; Villanueva *et al.*, 1994, 1996; Reed *et al.*, 1994).

IL-10 agisce in diversi modi per modulare le risposte immunitarie verso i parassiti, tra cui l'inibizione della produzione di IFN, necessario per attivare i macrofagi ad uccidere a livello intracellulare, e della produzione di IL-12, che induce risposte immunitarie cellulari protettive.

D'altra parte, la completa assenza di IL-10 in corso di infezioni acute esita anch'essa in patologia. L'infezione di topi KO per IL-10 con *Trypanosoma cruzi* risulta in una riduzione della parassitemia e una maggiore produzione di IFN γ (Abrahamsohn *et Coffman*, 1996). Inoltre, topi KO per IL-10 infettati con *Toxoplasma gondii* soccombono alle infezioni e hanno elevati livelli di TNF α , IFN, IL-1 e IL-12 nel siero e del polmone, il che implica un ruolo importante per IL-10 endogena nel ridurre la sintesi di monochine e le risposte innescate da IFN γ in corso di infezione acuta intracellulare e nella prevenzione dell'immunotolleranza (Gazzinelli *et al.*, 1996). Questi dati implicano un necessario equilibrio nella produzione di IL-10, IL-12, IFN γ nel determinare l'esito dell'infezione.

2.16 Tumor Necrosi Factor Alfa (TNF α)

Introduzione

L'indagine mirata ad individuare la causa di necrosi emorragica in corso di tumori ha portato alla scoperta del fattore di necrosi tumorale (TNF α).

Questa citochina è una proteina che esiste sia in forma solubile (lungo 157 aminoacidi) sia in una forma transmembrana (lunga 233 aminoacidi) ed è prodotta principalmente da macrofagi in risposta a vari stimoli infiammatori.

Essa media la sua azione attraverso due distinti recettori, il primo definito p60 e l'altro p80. Ricerche condotte negli ultimi anni hanno rivelato che, sebbene il TNF α sia necessario per la protezione contro le infezioni batteriche, esso modula anche la crescita cellulare, la replicazione virale, regola il sistema immunitario, in corso di shock settico, in malattie autoimmuni, l'artrite reumatoide, la flogosi e il diabete.

Agenti in grado di bloccare l'azione del TNF α quali recettori solubili e anticorpi anti-TNF α sono stati approvati per uso umano rispettivamente per la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), per l'artrite reumatoide e in corso di malattia infiammatoria cronica intestinale.

Struttura genica e proteica

Il TNF α maturo è una proteina lunga 157 aminoacidi contenente un ponte disolfuro ma non carboidrati; inoltre manca di metionina.

La massa molecolare della proteina TNF α in condizioni denaturanti è di circa 17 kDa; in condizioni native, tuttavia, il TNF α è un trimero con una massa molecolare di circa 50 kDa. Si tratta di una proteina acida con un punto di isoelettrico di circa 5,6 (Aggarwal *et al.*, 1985b), costituita interamente da beta pieghe (Narhi *et al.*, 1996).

La forma attiva del TNF α appare essere omotrimerica. La struttura cristallina del TNF α rivela che ogni monomero consta di due β pieghe disposte in modo antiparallelo con un anello che permette l'interazione fra le due in testa-coda a formare una struttura eterotrimerica (Eck *et Sprang*, 1989; Jones *et al.*, 1989).

Nelle specie di mammiferi la sequenza aminoacidica del TNF α alfa è altamente conservata (Van Ostade *et al.*, 1994a). La sequenza umana inoltre mostra molte similarità con la linfotossina (LT) (Aggarwal *et al.*, 1985b). La sequenza del TNF α è per un range che va dal 15 al 25% omologa agli altri membri della superfamiglia dei tumor necrosis factor che include FasL, LT, CD40L, CD27L, CD30L (Gruss *et Dower*, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 1999).

L'mRNA codifica per proteina precursore del TNF α di 233 aminoacidi (Pennica *et al.*, 1984). La sequenza di aminoacidi naturale del TNF α (Aggarwal *et al.*, 1985b) ha dimostrato che la proteina matura di 157 aminoacidi è preceduta da una sequenza segnale di 76 aminoacidi coinvolta nella secrezione proteica.

Essa è espressa come una proteina precursore transmembrana di tipo II di 26 kDa che viene convertita nella forma matura TNF α di 17 kDa.

Questa conversione è un processo altamente regolato che si verifica mediante clivaggio proteolitico dei 76 aminoacidi segnale dal peptide C-terminale della proteina legata alla membrana mediante una metalloproteinasi definita enzima di conversione del TNF α alfa (TACE) (Black and White, 1998).

Questo distacco è un passo essenziale prima del rilascio della citochina tanto che la soppressione del gene TACE risulta essere letale (Peschon *et al.*, 1998). Gli inibitori che

bloccano l'attività del gene TACE bloccano la diffusione del recettore del TNF α e la trasformazione del ligando (Crowe *et al.*, 1995).

Ci sono rapporti, inoltre, che indicano come la forma transmembrana di TNF α si leghi preferenzialmente con il recettore p75 (Grell *et al.*, 1995) ed è in grado di uccidere le cellule bersaglio mediante contatto cellula - cellula e di fornire il segnale di costimolazione dei linfociti B.

Fonti cellulari ed espressione tissutale

Il TNF α è prodotta da un'ampia varietà di tipi cellulari. Esso comprende, oltre a monociti e macrofagi, linfociti T, linfociti B, astrociti, fibroblasti, basofili, mastociti, le cellule NK, cellule di Kupffer, cellule della muscolatura liscia, cellule epidermiche, le cellule del tumore mammario, cellule di neoplasia ovarica, glioblastoma, melanoma, leucemia, tumori della prostata e tumori del pancreas (Aggarwal e Vilcek, 1992).

Infatti, dalla ricerca estesa nel corso degli ultimi dieci anni, è emerso che la capacità della maggior parte delle cellule per la produzione di TNF α è regolato dalla regione 3' del gene ricca di sequenze AU (ARE). Questa regione è responsabile per la destabilizzazione dell' mRNA codificante per TNF α e per la soppressione traslazionale. Infatti, topi transgenici privi della regione ARE del TNF α producono anormali livelli di TNF α (Kontoyiannis *et al.*, 1999).

Inizialmente i lipopolisaccaridi (LPS) ed gli esteri del forbolo (PMA) sono stati individuati come potenti induttori del TNF α (Pennica *et al.*, 1984; Aggarwal *et al.*, 1985b) ma in seguito sono stati individuati diversi altri.

Questi includono lipidi A (derivati da LPS), Ca^{2+} e ionofori e citochine stimolanti il sistema immunitario quali IL-1, IL-2, GM-CSF, IFN α , IFN β e IFN γ . Anche lo stesso TNF α può *up* regolare la propria sintesi attraverso l'attivazione di NF- κ B. In aggiunta, virus, funghi, parassiti, protozoi, immunocomplessi e cellule tumorali stimolano il rilascio del TNF α .

Diversi agenti al contrario *down regolano* l'espressione del TNF α , tra cui gli inibitori della sintesi delle prostaglandine (salicilato), gli inibitori della fosfodiesterasi, la ciclosporina A e le citochine immunosoppressive (IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 e TGF β).

Poiché la trascrizione del TNF α è dipendente, in parte, dall'attivazione del NF- κ B (Foxwell *et al.*, 1998) e in un secondo momento regolata da intermedi reattivi dell'ossigeno, la maggior parte degli inibitori dell'attivazione di NF- κ B (IL-10, IL-4, IL-11, IL -13, ormone melanocita stimolante, etc) e antiossidanti (superossido dismutasi, glutamil cisteina sintetasi, etc) hanno la capacità di ridurre l'espressione di TNF α .

Il TNF α si lega a due differenti recettori denominati p60 (anche chiamato p55, o di tipo I o CD120a) e p80 (chiamato anche p75 o di tipo II o CD120b), in base al loro peso molecolare.

Questi due recettori sono omologhi nel loro dominio extracellulare, ma distinti nel loro dominio intracellulare (Armitage, 1994; Darnay *et Aggarwal*, 1997).

Il recettore p60 è espresso su tutti i tipi di cellule, mentre il recettore p80 è espresso principalmente su cellule ematopoietiche del sistema immunitario e sulle cellule endoteliali.

Il legame del TNF α al suo recettore può essere spostato dalla somministrazione di LT, suggerendo un uso comune del recettore (Aggarwal *et al.*, 1985c).

Attività *in vitro*

TNF α è una citochina che presenta molteplici attività diverse in diversi tipi di cellule.

L'attività del TNF α nella maggior parte dei casi è potenziato dalla presenza di IFN α , IFN β e IFN γ (Aggarwal *et Eessalu*, 1987). L'attività citotossica di TNF α è anche potenziata da inibitori di trascrizione proteica o di traduzione (Kramer *et Carver*, 1986).

In generale, le citochine prodotte dalle cellule Th2 quali IL-4, IL-10 e IL-13 e TGF β *down* regolano l'espressione di TNF α prodotta da cellule Th1. In ogni caso la maggior parte degli stimoli infiammatori, infezioni, stress portano alla produzione di TNF α .

In aggiunta, gli inibitori delle serina-proteasi e delle caspasi sono anche noti per l'attività di *down* regolazione del TNF α (Suffys *et al.*, 1988; Tewari *et al.*, 1995).

Alcune proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 sono anche noti per bloccare l'attività di apoptosi del TNF α (Johnson *et Boise*, 1999). In maniera interessante, in alcune cellule, il TNF α induce l'espressione dei membri della famiglia Bcl-2 (Tamatani *et al.*, 1999), il che può spiegare la modalità attraverso la quale le cellule sviluppano la resistenza al TNF α .

Attività *in vivo*

Il ruolo fisiologico del TNF α *in vivo* non è chiaro. In generale, si ritiene che il TNF α sia richiesto per la protezione contro batteri, funghi, parassiti e forse anche infezioni virali e altri stimoli stressanti.

Oltre a determinare necrosi emorragica, il perchè TNF α sia in grado di bloccare l'evoluzione dei tumori e le metastasi *in vivo*, non è ancora pienamente compreso (Lejeune *et al.*, 1998).

Vi è anche la prova che il TNF α è coinvolto nella formazione dei tumori e nelle metastasi (Orosz *et al.*, 1993). Un rapporto indica che i topi deficienti di TNF α sono resistenti alla cancerogenesi della pelle (Moore *et al.*, 1999).

Le conoscenze acquisite nel corso degli anni hanno tuttavia dimostrato che il TNF α presenta delle preferenze di specie piuttosto che una specie-specificità. Ciò è ulteriormente supportato dal fatto che il recettore p60 non è specie-specifico mentre lo è il recettore p80.

Inoltre, il TNF α murino è più tossico per il topo *in vivo* del TNF α umano (Kramer *et al.*, 1988), suggerendo il ruolo sinergico dei recettori p60 e p80 nell'indurre gli effetti tossici.

La soppressione del gene TNF α nei topi ha mostrato che questi sviluppano normalmente. In tali animali il timo risulta normale, ma non lo è l'architettura splenica.

Nella milza di topi immunizzati KO per il gene del TNF α erano assenti sia i cluster follicolari delle cellule dendritiche sia i centri germinativi.

Inoltre, topi knockout per TNF α mostrano una bassa tossicità per tale proteina e sono resistenti alla letalità indotta da somministrazione di LPS (Marino *et al.*, 1997).

Coerentemente con il noto ruolo del TNF α nell'obesità indotta da insulino-resistenza nei topi, soggetti knockout per TNF α sono stati protetti da tale resistenza (Uysal *et al.*, 1997).

La stimolazione dell'*over expression* di TNF α induce diversi effetti nei topi, compresi tossicità localizzata nei tessuti, artrite infiammatoria cronica e una spontanea malattia infiammatoria demielinizzante.

L'*over expression* di TNF α da parte di astrociti o neuroni è sufficiente a scatenare una malattia neurologica caratterizzata da atassia, convulsioni, paresi con caratteristiche istopatologiche di infiammazione cronica e degenerazione della sostanza bianca nel CNS (Alexopoulou *et al.*, 1997).

Pertanto sia forme solubili e sia forme transmembrana del TNF α possono svolgere importanti ruoli *in vivo* nella patogenesi della infiammazione e demielinizzazione del CNS. Inoltre, quando il transgene TNF α è espresso in linfociti T esso determina cachessia e anomalie linfoidi nei topi.

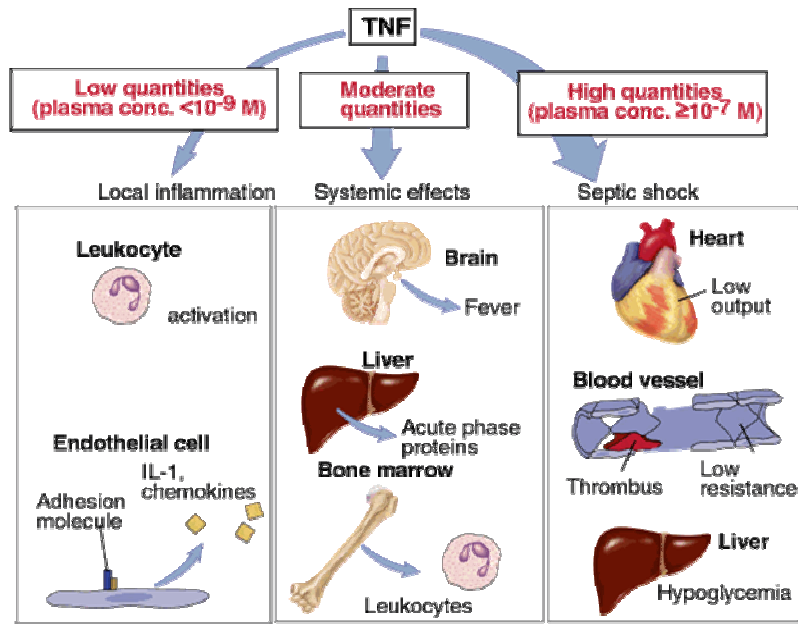


Fig. 2.12 Effetti di TNF- α in vivo a diverse concentrazioni.

TNF α è una citochina dotata di pleiotropismo che produce diverse risposte immunologiche e infiammatorie nell'organismo.

La somministrazione di TNF α porta a emorragia, necrosi, infiammazione locale, shock e morte. Notevoli differenze riferite alla dose letale di TNF α sono legate alle specie-specifiche affinità del recettore (Broukaert *et al.*, 1992) L'iniezione sottocutanea e intradermica di TNF α conduce rapidamente alla marginazione dei neutrofili e alla formazione di edema (Dunn *et al.*, 1989; Rampart *et al.*, 1989).

La somministrazione sottocutanea di TNF α anche in babbuini ha portato ad emorragia, necrosi, e densi aggregati di macrofagi e neutrofili mentre la somministrazione sistemica di TNF α in tali animali determina ipotensione acuta, tachicardia, aumento di lattato plasmatico e disfunzioni organiche (Van Zee *et al.*, 1994). La somministrazione del TNF α ai cani determina danni tissutali irreversibili e la morte (Tracey *et al.*, 1987).

Inoltre, nei babbuini il TNF α che si lega al recettore p80 è risultato essere meno tossico rispetto a quello che lega al recettore p60.

Poichè TNF α risulta non essere tossico se somministrato a topi privi del recettore p60 (Rothe, *et al.*, 1993), la maggior parte delle tossicità sistemiche è stata associata alla presenza di tale recettore.

L'esposizione prolungata a TNF α causa anoressia, perdita di peso, disidratazione, perdita di proteine e lipidi corporei. Questa condizione, chiamata cachessia, può verificarsi durante patologie croniche parassitarie, batteriche e infezione virali. I sintomi compaiono anche in pazienti affetti da cancro. Il mediatore coinvolto in questo processo è stato nominato *cachectina*, più tardi riconosciuto essere lo stesso del TNF α . E' noto che le citochine regolano la sintesi di numerosi enzimi metabolici, ad esempio, la lipoprotein-lipasi, aumentando la sintesi delle proteine di fase acuta e favorendo la lipolisi quale fonte di energia. Queste reazioni sono identiche a quelle conseguenti a infezione cronica e cancro. In gravi malattie come l'AIDS, il livello di TNF α è significativamente aumentato quando i segni ed i sintomi di cachessia vanno sviluppandosi (Benyoucef *et al.*, 1996).

TNF α è una citochina infiammatoria ad azione chemiotattica verso monociti e neutrofili. La stimolazione di queste cellule con TNF α induce fagocitosi, aderenza alle cellule endoteliali e generazione di radicali liberi dell'ossigeno quali anioni superossido e perossido di idrogeno. La stimolazione di cellule endoteliali umane in coltura con procoagulante induce l'attività del TNF α (Fig 2.13).

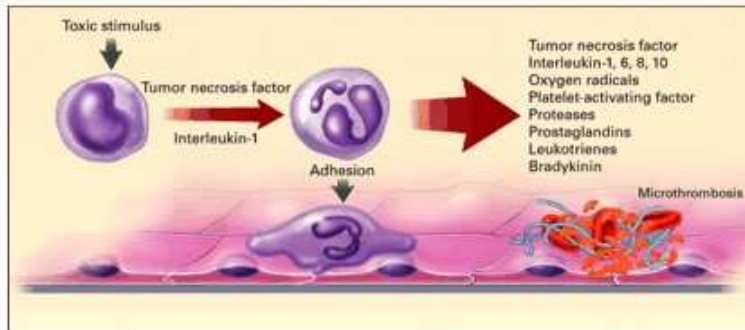


Fig 2.13 Azione esercitata dal Tumor Necrosis Factor nella formazione di microtrombi

L'attivazione indotta dal TNF α in cellule endoteliali porta alla riorganizzazione strutturale dell'endotelio quando questo presenta una elevata permeabilità, dovuta alla sua capacità di up regolare VEGF, noto anche come fattore di permeabilità vascolare (Giraudo *et al.*, 1998). TNF α aumenta l'espressione di ICAM-1 endoteliale e della molecola di adesione leucocitaria di tipo 1 (ELAM-1). Entrambe le molecole sono in grado di legarsi a neutrofili e monociti e tale effetto rappresenta un aspetto molto importante durante l'interazione transcapillare che porta alla migrazione delle cellule.

TNF α induce la sintesi di altri chemochine, come MCP-1, che promuove l'accumulo di monociti nel sito di infiammazione. In diverse malattie infiammatorie come l'artrite reumatoide e le malattie autoimmuni correlate, il TNF α è prodotto in siti di infiammazione (Feldmann *et al.*, 1995), suggerendo il suo ruolo nella degradazione tissutale come pure nell'amplificare la risposta infiammatoria.

I lipopolisaccaridi (LPS) sono uno dei principali induttori della produzione di TNF α sia *in vitro* sia *in vivo*. La somministrazione di alte dosi di LPS o l'infezione da batteri Gram-negativi porta a shock settico. TNF α è considerato un importante mediatore di sindrome da shock settico, perché è sovraespresso durante sepsi e provoca shock e lesioni dei tessuti in maniera identica alla sepsi tanto che gli anticorpi anti-TNF α somministrati tempestivamente proteggono gli animali. Inoltre, topi transgenici con mutazione a carico del recettore p60 del TNF α non hanno mostrato tale reazione. Tuttavia, ad oggi, la terapia mediante uso di anticorpi anti-TNF α non ha avuto successo negli studi clinici di sepsi.

TNF α è coinvolto nel rimodellamento del tessuto connettivo. TNF α induce il rilascio di collagenasi e di altri enzimi metalloproteasi di matrice in fibroblasti e cellule sinoviali. Esso inibisce la sintesi del collagene nelle ossa, riduce il contenuto di fosfatasi alcalina nella cartilagine espianata e induce il riassorbimento di proteoglicani.

TNF α agisce in sinergia con IFN *in vivo* per il suo effetto antitumorale (Lienard *et al.*, 1992) e per gli effetti antiparassitari (Liew *et al.*, 1990). Sebbene questa attività non sia ancora stata pienamente dimostrata *in vivo*, *in vitro* TNF α induce la produzione di IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, M-CSF. In vivo, dopo somministrazione di LPS, sono stati prodotti TNF α , IL-1 e IL-6.

Analogamente, IL-6 e varie CSFs regolano la produzione di TNF α *in vitro*. IL-1 è in grado di stimolare la produzione di TNF α *in vitro*, ma questo non sembra verificarsi in colture di tessuti affetti da artrite reumatoide (Butler *et al.*, 1995).

Forse il più potente inibitore del TNF α è la forma solubile del recettore del TNF α , che quando si dispone sulla superficie cellulare è efficace nel bloccare l'attività del TNF α . Basato su studi *in vitro* anche TGF, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13 possono inibire la produzione o bloccare l'azione del TNF α mentre il suo principale induttore *in vivo* è l'IFN γ .

TNF α non viene rilevato nel siero di soggetti sani. mentre ha dimostrato svolgere un ruolo in una grande varietà di malattie.

Nell'artrite reumatoide umana, la proteina del tumor necrosis factor è stata osservata nel liquido sinoviale e mRNA codificante per TNF α è stato riscontrato in cellule sinoviali, compresi i monociti e macrofagi (Yocum *et al.*, 1989; Macnaul *et al.*, 1990).

Poiché il TNF α è stato rilevato anche in pazienti affetti da cancro, in particolare quelli con malattia di Hodgkin, non è chiaro che cosa faccia produrre TNF α alle cellule. Forse la più probabile fonte sono le cellule tumorali stesse. Basandosi su esperimenti *in vitro* è stato dimostrato il ruolo del TNF α in tumori e metastasi.

Terapia

Anticorpi contro il TNF α sono stati utilizzati in modelli animali per bloccare lo shock settico endotossino-indotto e altre malattie infiammatorie. Gli anticorpi sono stati impiegati anche in soggetti umani per trattare l'artrite reumatoide, la malattia di Crohn e lo shock settico.

Inoltre, la talidomide, che inibisce la produzione del TNF α , è stata approvata per l'uso in pazienti affetti da AIDS (Klausner *et al.*, 1996).

TNF α è una delle prime citochine prodotte in risposta a una varietà di insulti e dato il suo potenziale patogenico, questo ha permesso di considerare l'ipotesi di testare la terapia anti-TNF α quale buona soluzione verso un largo spettro di patologie in modelli animali.

I modelli sperimentali di sepsi indotta (Hinshaw *et al.*, 1990; Walsh *et al.*, 1992) hanno considerato l'iniezione con un gran numero di batteri gram-negativi, ma il fattore critico è stato individuato nel tempo di somministrazione della terapia anti-TNF α .

Una protezione era ottenuta solo se la terapia anti-TNF α veniva somministrata prima o al tempo stesso dell'infezione. Poche ore di ritardo causavano la perdita di protezione.

Questo è stato ribadito da risultati ottenuti in studi clinici di sepsi, che sono stati deludenti allo stesso modo. Successivamente, la terapia anti-TNF α è stato provato in modelli animali di artrite reumatoide.

La terapia con anticorpi mirati contro TNF α è stata trovata essere protettiva in modelli animali quali l'artrite collagene-indotta, l'artrosi adiuvante, come pure nell'artrite da parete cellulare di streptococco (Thorbecke *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992). I risultati sono serviti da conferma del successo della terapia anti-TNF α nell'artrite reumatoide.

Sono stati analizzati anche modelli animali di malattia infiammatoria quali esempi di flogosi intestinale. E 'stato trovato che in IL-10-topi knockout vi era piccolo vantaggio, ma successivi studi hanno mostrato chiari benefici. Lo stesso vale per il modello di trasferimento dei linfociti T e conferma il successo della terapia anti-TNF α nella malattia di Crohn (Powrie *et al.*, 1994; Neurath *et al.*, 1997).

Interessanti risultati sono stati ottenuti in corso di encefalomielite allergica sperimentale. Il trattamento di topi sotto trasferimento di linfociti T sensibilizzati è stato efficace (Ruddle *et al.*, 1990), e il trattamento dei topi con encefalomielite cronica recidivante ha mostrato un effetto benefico nella somministrazione intraperitoneale di anticorpi anti-TNF α .

Era interessante notare che se i topi venivano iniettati per via cerebrale erano necessari molti meno anticorpi (Baker *et al.*, 1994).

Questo suggerisce che la componente attiva favorevole di una terapia anti-TNF α è determinata in questo modello di EAE da quello che entra nel cervello.

In questo contesto è interessante il fatto che l'unico anti-TNF α biologico, che è stato provato nella sclerosi multipla, TNF α Rp55: Fc proteina di fusione (lenercept) non ha portato ad alcun miglioramento clinico. Il meccanismo più semplice per spiegare questa differenza potrebbe essere l'incapacità del TNF α Rp55: Fc ad attraversare la barriera emato-encefalica.

La prima malattia ad essere trattata con anticorpi anti-TNF α è stata la sepsi. I risultati, tuttavia, non sono stati clinicamente incoraggianti.

Non è chiaro il motivo per cui gli studi clinici non hanno avuto successo, ma una probabile ragione è il fatto che i pazienti in sepsi, a differenza dei modelli animali, sono trattati piuttosto tardivamente nel corso della malattia.

Un altro motivo è il fatto che altre malattie gravi, come il diabete o il cancro, tendono ad essere alla base della sepsi.

Uno degli aspetti sconcertanti è la mancanza di ripetibilità nei risultati ottenuti nel corso dei vari studi clinici: alcuni risultati sono nulli, non mostrando nessun peggioramento ma neanche nessun vantaggio, mentre l'uso di proteina di fusione solubile TNF α R: Fc in una piccola porzione di pazienti ha portato ad un peggioramento dose-dipendente nel risultato clinico (Abraham *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1996).

La più ampia serie di studi di blocco del TNF α sono stati effettuati nell'artrite reumatoide (**fig 2.14**).

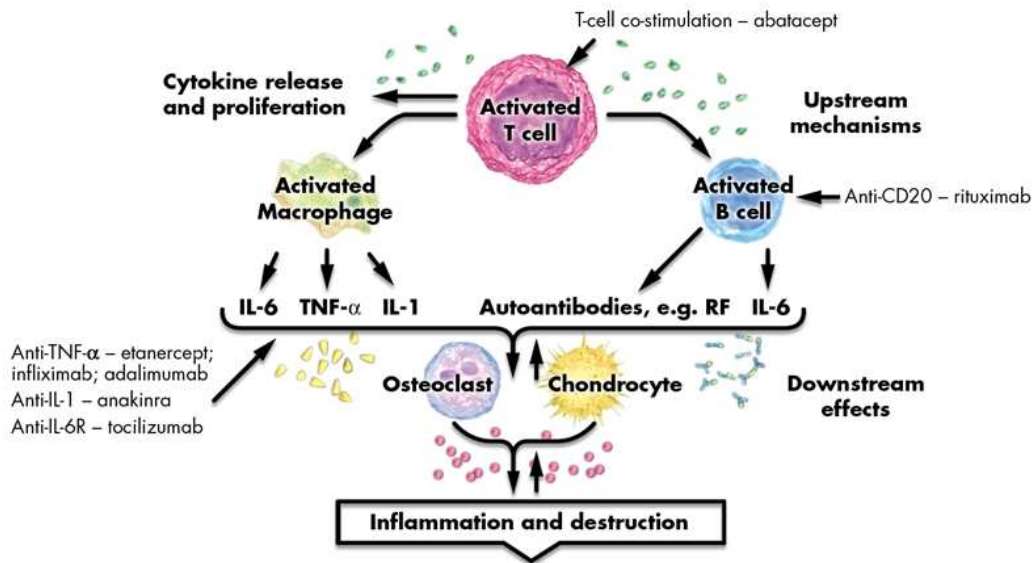


Fig 2.14 Rappresentazione schematica dell'azione di alcune terapie in corso di artrite reumatoide e meccanismo d'azione.

Diversi agenti biologici anti-TNF α sono stati utilizzati clinicamente, con rapporti di successo per tutti loro (Feldmann *et al.* 1995, 1997).

La dose di anticorpo utilizzata è stata paragonabile a quella riscontrata essere efficace nel modello murino di artrite collagene-indotta (Williams *et al.*, 1992). Vi è stato un beneficio sintomatico, ivi compresa la riduzione del dolore e rigidità mattutina, così come segni come gonfiore delle articolazioni, iniziando entro poche ore. Sollievo da stanchezza e letargia sono state rilevate in poche ore; inoltre si sono evidenziate rilevate drastiche riduzioni nel gonfiore delle articolazioni entro 2 settimane (Elliott *et al.*, 1993).

I risultati della terapia derivante dall'associazione di anti-TNF α con metotrexate (MTX) sono stati interessanti.

In occasione di una bassa dose si è notato un beneficio transitorio, che non è stata mantenuto nonostante le ripetute iniezioni. Tuttavia a quella dose, in presenza di basse dosi di metotrexate c'è stato un significativo effetto clinico.

La terapia mediante anticorpi anti-TNF α coinvolge diversi meccanismi di azione.

Il primo meccanismo dagli studi *in vitro* con artrite sinoviale reumatoide umana ha visto una *downregulation* della cascata di citochine.

Ciò è stato dimostrato facilmente valutando i livelli sierici di IL-6, ma sono state registrate anche riduzioni sieriche di IL-1, così come di VEGF e chemochine (Lorenz *et al.*, 1996; Paleolog *et al.*, 1998; Charles *et al.*, 1999).

Il secondo importante meccanismo è stato una riduzione della cellularità sinoviale, in parte dovuta al ridotto traffico leucocitario. In seguito a terapia anti-TNF α l'espressione di molecole di adesione (ad esempio, E-selectina, ICAM-1) è diminuita, come lo è quella delle chemochine (Paleolog *et al.*, 1996). Inoltre è stato ipotizzato un aumento della apoptosi all'interno dell'articolazione ma questo non è stato ancora verificato. Un terzo meccanismo è la riduzione della produzione di VEGF e conseguentemente dell'angiogenesi dopo somministrazione di anticorpo anti-TNF α (Paleolog *et al.*, 1998).

La somministrazione di una terapia anti TNF α in modelli sperimentali di sclerosi multipla con anticorpi anti-TNF α , al contrario di quanto accaduto per l'encefalomielite allergica sperimentale (EAE), non ha mostrato alcun successo (Ruddle *et al.*, 1990; Baker *et al.*, 1994).

Inoltre questa mancanza di effetti veniva aggravata dal peggioramento dato dal numero di recidive cliniche nelle 24 successive con effetti dose -dipendenti.

La ragione di questo peggioramento, in contrasto con il beneficio visto in modelli animali, non è noto. Un'ipotesi è che esso sia dovuto all'incapacità della proteina di fusione di entrare nel CNS, dove si dovrebbe esercitare il beneficio, come suggerito dall'iniezione intracerebrale anti-TNF α in studi murini (Baker *et al.*, 1994).

Diversi studi clinici sono stati effettuati con il TNF α , la maggior parte dei quali in pazienti affetti da cancro (Lejeune *et al.*, 1998). Forse i più incoraggianti studi finora dimostrano che dosi elevate di TNF α insieme con la chemioterapia, con o senza IFN γ , può essere somministrato con sicurezza attraverso perfusione locoregionale dell'arto.

Questa procedura determina la remissione completa dei casi di melanoma in metastasi e la completa remissione nei casi di sarcoma dei tessuti molli.

2.17 Interferone γ (IFN γ)

Introduzione

L'interferone γ (IFN γ) è prodotto principalmente da linfociti attivati e ha recettori su praticamente tutti i tipi di cellule dell'organismo. Esso, pertanto, esercita una moltitudine di effetti biologici cellulari.

Tra le citochine, l'IFN γ è il principale attivatore dei macrofagi ed in aggiunta ha un ruolo nell'attivazione delle cellule endoteliali. Queste due attività in associazione fanno attribuire all'IFN γ un ruolo da citochina pro infiammatoria. Il ruolo regolatore sulle fasi antigenespecifiche della risposta immunitaria derivano invece dai suoi effetti sulle cellule presentanti l'antigene (*Antigen Presenting Cells, APC*) e sui linfociti T e B.

L'IFN γ infatti aumenta l'espressione di molecole MHC su APC, esercitando complessi effetti su proliferazione e differenziazione dei linfociti T e B.

La produzione di IFN γ da parte di linfociti T helper è un segno distintivo del fenotipo Th1. Pertanto, ad alti livelli di produzione di IFN γ è tipicamente associata un'efficace difesa contro gli agenti patogeni intracellulari e gran parte dei processi immunitari in corso di patologie autoimmuni.

Nonostante il forte potenziale immunoregolare dell'IFN γ e la disponibilità di preparati per la somministrazione clinica ai pazienti, le sue applicazioni terapeutiche sono ancora limitate (Young *et al.*, 1995; Young, 1996; Boehm *et al.*, 1997; Stark *et al.*, 1998).

Struttura genica e proteica

In tutte le specie caratterizzate fino ad oggi, IFN γ è risultato essere codificato da una singola coppia di geni costituita da quattro esoni; il confronto derivante dai sequenziamenti nei diversi animali mostra come tale mediatore immunitario abbia una struttura altamente conservata (Kaiser *et al.*, 1998).

Lo stato attuale degli studi suggerisce un meccanismo molto complesso di trascrizione genica da parte dell'IFN γ , che si svolge su tre diversi livelli di regolamentazione: la metilazione, siti per l'attivazione dei fattori di trascrizione e un sito per i repressori (Young, 1996).

In primo luogo, l'ipometilazione di isole CG della regione promotrice prossimale nel primo introne correla con l'espressione del gene. Una differenza significativa in stato di metilazione è stato osservato in linfociti T CD4 + della memoria umani (IFN γ produttori) messi a confronto con linfociti T adulti naïve (Melvin *et al.*, 1995).

Lo stesso vale per i topi in cui il promotore non è metilato in cellule Th1 (IFN γ produttori), ma è metilato in linfociti Th2 non produttori (Young *et al.*, 1994).

In secondo luogo il primo introne contiene alcuni importanti siti per il controllo della regolazione trascrizionale. Non contiene solo un elemento c-Rel e NF- κ B p65/p50-legante (Brown *et al.*, 1992; Sica *et al.*, 1992) che migliorano il promotore di attività, ma in esso sono stati identificati siti anche per STAT1, STAT4, STAT5 e STAT6 (Xu *et al.*, 1996; Sica *et al.*, 1997).

In terzo luogo, diverse linee di ricerca hanno evidenziato un ruolo cruciale per i fattori di repressione nucleare verso la trascrizione del gene IFN γ . (Chrivia *et al.*, 1990; Ye *et al.*, 1994).

La soppressione della trascrizione di IFN γ attraverso glucocorticoidi segue ancora un diverso percorso. I fattori necessari infatti per l'inibizione glucocorticoidi-mediata della trascrizione di IFN γ utilizzano gli stessi siti di regolamentazione necessari per l'induzione del promotore (Cippitelli *et al.*, 1995).

In conclusione, sia il rafforzamento e sia la repressione dei fattori di trascrizione dell'espressione del gene IFN γ sembrano essere regolamentati attraverso l'interazione con il promotore ed elementi cis-intronici.

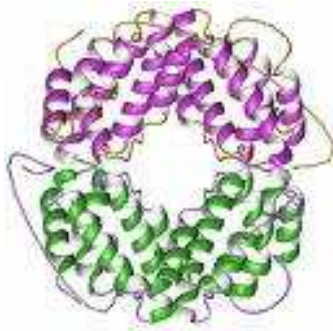


Fig 2.15.
Struttura proteica dell'interferone gamma (IFN γ)

I precursori di IFN γ umano e murino consistono di 166 e 155 aminoacidi, rispettivamente. Dopo la rimozione del peptide segnale, le forme mature che si vanno a generare presentano pesi molecolari di circa 17,1 kDa (15,9 nel caso dell'IFN γ murino). Mentre l'IFN γ maturo murino (MuIFN γ) contiene un singolo residuo cisteinico in posizione C-terminale, l'interferone umano (HuIFN γ) è privo di cisteina. Ciò esclude un ruolo di legami disolfuro nella struttura di formazione terziaria (Fig 2.15).

La maggior parte degli IFN γ di mammiferi sono in possesso di due N-glicosilazione, sebbene queste siano posizionate in regioni non costanti. Il confronto fra sequenze di IFN γ di varie specie dimostra che la maggior parte delle sequenze conservate si trovano in eliche C ed F, che sono le due più interne nella struttura del dimero.

Fonti cellulari ed espressione tissutale

IFN γ è una tipica linfochina, essendo prodotto quasi esclusivamente da sottopopolazioni di linfociti T helper 1 (Th1) e da cellule NK. La produzione avviene se queste cellule sono correttamente attivate *in vivo* o *in vitro*. Nel sistema umano, i linfociti T che esprimono l'antigene di membrana CD30 attivazione-dipendente sono stati individuati come i principali produttori di IFN γ (Alzona *et al.*, 1994). Entrambi i linfociti CD4 + e CD8 + possono produrre IFN γ . In letteratura sporadiche segnalazioni descrivono la produzione di IFN γ in colture di fagociti mononucleati (Fultz *et al.*, 1995; Gessani e Belardelli, 1998), di granulociti neutrofili (Yeaman *et al.*, 1998), di neuroni (Neumann *et al.*, 1997) e linee cellulari neuronali (Watanabe *et al.*, 1989).

L'espressione tissutale di IFN γ può essere studiata con diversi approcci quali colorazioni immunofluorescenti di sezioni tissutali, determinazione delle proteine nel tessuto estratto e quantificazione dell'mRNA codificante per IFN γ in estratti di tessuto.

In vivo, l'IFN γ è prodotto in tessuti infiltrati da linfociti attivati, in particolare nei focolai di infiammazione acuta dovuta a risposte immunitarie antigene-specifiche (ad esempio, nel sistema nervoso centrale in seguito a encefalomielite allergica sperimentale (EAE) e nelle articolazioni nell'artrite autoimmune), e in organi linfoidei periferici durante l'infiammazione locale o generale (ad esempio nel quadro della risposta di fase acuta che segue all'esposizione ad endotossine).

Ogni volta che IFN γ è prodotto in qualche parte del corpo, esso è anche in grado di entrare nel sangue ma è rapidamente eliminato, in modo che esso diventa rilevabile nel siero di solito in piccole concentrazioni e per una durata relativamente breve.

Cellule NK e linfociti T non producono IFN γ finché sono quiescenti. Molti agenti possono attivare la produzione di tale citochina. Anche se è ormai consueto distinguere tra quelle che possono scatenare la produzione di per se (spesso definiti come 'induttori') e quelli che possono solo aumentare la produzione già innescata, questa distinzione è di solito difficile da fare.

Il motivo principale è che proprio l'attivazione di cellule T o NK da parte di agenti esogeni richiede la cooperazione di cellule accessorie, quali ad esempio, fagociti mononucleati, i quali a loro volta necessitano di essere attivati.

Queste cellule producono fattori solubili costituiti da altre citochine (ad esempio TNF α , IL-12, IFN γ , etc), che agiscono come stimolatori o induttori endogeni nella produzione di IFN γ . Inoltre, queste cellule prendono contatto fisico con i linfociti attraverso molecole di membrana, per esempio il sistema CD40/CD40L, e quindi forniscono il cosiddetto segnale di costimolazione necessario per un'attivazione ottimale.

Gli stimoli esogeni che possono suscitare la produzione di IFN γ sono i più disparati: in linea di principio sono ligandi di recettori o molecole simil-recettoriali sulle cellule produttrici. Alcuni sono normalmente presenti *in vivo* in seguito a situazioni naturali quali traumi, infezioni, tumori, allergie o autoimmunità. Altri sono noti in letteratura in quanto utilizzati come induttori artificiali negli esperimenti.

Qualsiasi sostanza riconosciuta da linfociti T come *non-self* può attivare queste cellule e, di conseguenza, indurre la produzione di IFN γ , insieme ad un certo numero di altre citochine.

Un classico sistema è costituito dall'immunizzazione di topi con un potente antigene verso i linfociti T, quali ad esempio dei micobatteri uccisi, poi i linfociti derivanti da milza o linfonodi precedentemente stimolati vengono nuovamente sollecitati con lo stesso antigene in coltura. La pre-immunizzazione *in vivo* è necessaria per l'espansione clonale dei linfociti T reattivi in modo che la coltura conterrà un numero sufficiente di linfociti T di memoria per la generazione di IFN γ in quantità rilevabili.

Alcuni microrganismi che infettano gli esseri umani o animali producono superantigeni, come ad esempio le enterotossine stafilococciche. Come gli altri antigeni, queste sostanze si legano ai recettori dei linfociti T (TCR), ma legandosi ad una parte meno variabile di tale molecola (catena V β), più cloni allo stesso tempo sono impegnati nella reazione e in tal modo non è richiesta l'espansione clonale per indurre una cospicua produzione di IFN γ .

I superantigeni possono quindi indurre una cospicua produzione di IFN γ in colture di cellule mononucleate prelevate da animali non immunizzati. Come eccezione alla regola generale per cui l'induzione di IFN γ in cellule NK richiede l'aiuto di cellule accessorie, è stato riferito che il superantigene SEB può indurre la produzione di IFN γ in maniera indipendente in cellule NK (D'Orazio *et al.*, 1995).

Il lipopolisaccaride (LPS), della membrana esterna dei batteri gram-negativi è un potente induttore di IFN γ . I sistemi recettoriali per LPS sono presenti su molti tipi di cellule, che vanno dai leucociti ai fibroblasti.

L'iniezione di LPS negli animali determina una produzione di IFN γ che raggiunge il suo picco in circa 6 ore e svanisce in meno di 24 ore. L'IFN γ prodotto in risposta ad iniezione di LPS apparentemente proviene da cellule NK, nonché linfociti T CD4 + e CD8 +, in quanto l'mRNA è rintracciabile in tutte e tre le popolazioni (Heinzel *et al.*, 1994).

Un confronto tra la produzione di IFN γ in colture di splenociti murini di ceppi reattivi e non, ha portato alla conclusione che i batteri Gram-negativi necessitano della presenza di fagociti mononucleati per indurre IFN γ (Yaegashi *et al.*, 1995). Inoltre, in topi iniettati con endotossine, l'immissione in circolazione di IL-12, una monochina stimolante i linfociti NK, precede la

produzione di IFN γ tanto che il pretrattamento con anticorpi anti-IL-12 inibisce la produzione di IFN γ (Heinzel *et al.*, 1994). Tuttavia, non solo citochine monociti-derivate, ma anche l'IL-2, prodotta da cellule Th1 può stimolare la produzione di IFN γ da parte di cellule NK (Scharton e Scott, 1993).

Non è escluso che componenti batterici diversi da quelli indicati possano agire come induttori nella produzione di IFN γ . In corso di infezioni batteriche da Gram positivi, ad esempio la listeriosi, i linfociti NK rivestono un ruolo preponderante nella produzione di IFN γ , che rappresenta la modalità di resistenza all'infezione dell'ospite (Dunn *et North*, 1991). Allo stesso modo, nelle infezioni parassitarie, quale la *Leishmaniosi*, una precoce produzione di IFN γ fornita da cellule NK è di importanza cruciale per l'evolversi infezione (Scharton e Scott, 1993).

Le lecitine vegetali, in particolare fitoemagglutinina A (PHA) e concanavalina A (Con A), in virtù della loro affinità per le glicoproteine della membrana linfocitaria, sono potenti induttori mitogeni e di citochine. Di conseguenza, sono stati utilizzati come induttori artificiale di IFN γ in colture di leucociti.

Allo stesso modo, gli anticorpi diretti verso componenti della membrana dei linfociti possono essere utilizzati sperimentalmente come induttori di linfocine, compreso IFN γ .

Siero policlonali antilinfocita (SLA), così come gli anticorpi monoclonali, in particolare quelli rivolti verso l'antigene universale dei linfociti T CD3, possono essere utilizzati *in vitro* e *in vivo*. Questi induttori artificiali di IFN γ sono stati particolarmente utili per l'elaborazione di sistemi di produzione delle proteine IFN γ e nell'analizzare il ruolo delle diverse popolazioni cellulari, citochine e altri mediatori quali fattori di produzione e di regolamentazione di IFN γ .

Due fattori puramente endogeni quali IL-12 e IL-18 sono stati finora descritti come 'induttori di IFN γ ', il che implica che essi possono attivare la produzione di IFN γ indipendentemente dalla presenza di stimoli esogeni, anche se forse necessitano di altri fattori endogeni.

IL-12, noto anche come uno 'fattore stimolatore dei linfociti NK', è una citochina eterodimerica costituito da due subunità, una 40 kDa (p40) e l'altra di 35 kDa (p35) (Bruna, 1994; Trinchieri, 1995). E' prodotta principalmente da macrofagi attivati e linfociti B ed esercita molteplici effetti su linfociti T e cellule NK. Si tratta di un potente induttore di IFN γ in queste cellule. Inoltre, IL-12 svolge un ruolo importante nel promuovere lo sviluppo e la differenziazione nella produzione di IFN γ da parte di linfociti Th1 (Manetti *et al.*, 1993; Trinchieri, 1993).

IL-18 (Dinarello *et al.*, 1998) è una proteina monomeric (18-19 kDa) descritta originariamente come 'fattore IFN γ -induttore'. Essa è prodotta come precursore da diversi tipi di cellule, tra cui fagociti mononucleati e cheratinociti.

La molecola pro-IL-18 viene scissa nella forma attiva di IL-18 dalla caspasi 1 mentre l'IL-18 in forma attiva è disattivata dalla caspasi 3. IL-18 induce la produzione di IFN γ o la aumenta in presenza di altre citochine, quali IL-2 e IL-12. Il ruolo di IL-12 sembra consistere nell'indurre l'espressione del complesso recettoriale per IL-18 sui linfociti T. Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo cruciale di queste due citochine *in vivo* nell'induzione di IFN γ da parte di vari agenti esogeni.

Al contrario, un potente inibitore della produzione di IFN γ è costituito dall'IL-10.

L'IL-10, originariamente denominato come 'fattore inibitorio la sintesi di citochine' (Moore *et al.*, 1993), viene prodotto principalmente da linfociti TH2, anche se monociti e linfociti B possono essere coinvolti nella sua produzione.

La produzione di IL-10 da parte di fagociti mononucleati sembra essere indotta soprattutto in un modo autocrino dal TNF α (Wanidworanun e Strober, 1993). Il potente effetto inibitorio dell'IL-

IL-10 sulla produzione di IFN γ è provato dal fatto che la somministrazione di IL-10 è in grado di inibire lo shock indotto da SEB nei topi (Florquin *et al.*, 1994).

L'effetto antagonista di IL-10 sull'IFN γ è reciproco. La produzione di IL-10 in monociti è inibito da IFN γ (Chomarat *et al.*, 1993). Sembra quindi probabile che l'equilibrio tra IL-10 e IFN γ nelle prime fasi di una risposta immunitaria sia di importanza cruciale per determinare l'ulteriore decorso della risposta. Per esempio, la stimolazione selettiva della produzione di IL-10 è stata proposta come una strategia utilizzata da alcuni microrganismi, in particolare elminti e protozoi, nel sottrarsi alle difese IFN γ attuata dall'ospite.

La produzione di IFN γ in linfociti T è anche sotto il controllo delle prostaglandine. Le PGE₂ inibiscono la produzione di IFN γ e IL-2 in linfociti Th1 ma non la produzione di IL-4 in linfociti Th2. L'AMPc è coinvolto in questo meccanismo di controllo, che permette alle PGE₂ di direzionare le risposte immunitarie verso una risposta Th2 (Snijdwint *et al.*, 1993).

Attività *in vitro*

IFN γ è noto potenziare la reattività del *burst respiratorio* dei macrofagi conseguente ad eventi stimolanti, con aumento della produzione di ossidanti altamente reattivi come perossido d'idrogeno (H₂O₂) e anione superossido (O₂⁻) (Nathan *et al.*, 1983). Questi effetti dell'IFN γ sono ritenuti regolare la trascrizione dei geni codificanti per gli enzimi del sistema NADPH ossidasi (Cassatella *et al.*, 1990). Questo sistema membrana-associato è a riposo in cellule quiescenti ma diventa attivo durante la fagocitosi o dopo interazione con alcuni stimoli solubili. Inoltre, anche l'IFN γ stimola la produzione di NO, che a sua volta può reagire con H₂O₂ per generare ossigeno reattivo.

IFN γ ha un ruolo importante nella produzione di ossido nitrico (NO). Varie cellule sintetizzano e rilasciano NO endogeno quale messaggero a breve distanza e di breve durata (Moncada e di Higgs, 1993). La sintesi NO inducibile (iNOS) si verifica, *in vitro*, in fagociti mononucleati, granulociti, fibroblasti, cellule di Kupffer, epatociti, cellule endoteliali, cellule della muscolatura liscia vascolare e, probabilmente, in molti altri tipi di cellule.

In macrofagi e fibroblasti, gli induttori naturali dell'attività enzimatica sono citochine ed endotossine. La massima attivazione delle cellule per la produzione di NO attraverso questo percorso si ottiene mediante una loro esposizione a combinazioni di IFN γ e endotossina, IFN γ e TNF β , o IFN γ e IL-1 β . Come atteso, i macrofagi di topi con una mirata alterazione del gene del recettore per IFN γ sono stati trovati incapaci di produrre NO in risposta a IFN γ il che indica come tale citochina sia cruciale per il controllo nella sintesi di NO (Kamijo *et al.*, 1993b).

Macrofagi in cui è indotta la produzione di NO mediante IFN γ hanno attività citocida verso altre cellule, ad esempio, cellule tumorali, in cui non può essere generato NO. La morte cellulare in questo caso può essere imputabile all'interruzione della respirazione mitocondriale (Henry *et al.*, 1993), ma può essere coinvolta anche la generazione di perossinitrato. La produzione di NO in fagociti è associata ad una ridotta sopravvivenza dei microrganismi inglobati. La sintesi di NO IFN γ -indotta determina un'aumentata difesa contro l'infezione da batteri, muffe o protozoi (Green *et al.*, 1991). Tuttavia, l'effetto citotossico indotto da NO può anche causare danni alla cellula e ai tessuti e bisogna quindi tener conto di alcuni effetti deleteri dell'IFN γ endogeno *in vivo*.

In considerazione degli effetti di NO sul sistema vascolare, si può proporre che NO prodotto da macrofagi IFN γ -attivati è in parte responsabile della vasodilatazione locale e della risposta iperdinamica circolatoria associata ad infiammazione. L'ipotensione che si verifica in corso di sindrome da shock settico sembra essere in parte a causa di un numero eccessivo di produzione di NO determinato dal massivo rilascio di citochine indotto dalle endotossine.

Infine, la produzione NO contribuisce agli effetti antivirali di IFN γ in macrofagi infettati con *vaccinia virus* o *herpes simplex virus 1* (Karupiah *et al.*, 1993b). In linee cellulari simil macrofagiche, NO IFN γ -indotto è stato riscontrato inibire la replicazione del DNA, la sintesi delle proteine virali tardive e particelle di montaggio del virus vaccinia ma non alterare la sintesi proteica precoce (Harris *et al.*, 1995).

Uno delle migliori azioni documentate da parte dell'IFN γ è l'induzione nell'espressione di antigeni MHC di classe II in gran parte delle cellule in coltura.

IFN γ quindi ha la capacità di migliorare o indurre in tali cellule la presentazione dell'antigene.

Anche l'espressione di MHC di classe I può essere migliorata sotto l'influenza di IFN γ . Cellule in cui si verifica questo effetto, quindi, possono diventare obiettivi migliori per linfociti T citotossici in grado di riconoscere antigeni virali, tumorali o autoantigeni presenti su tali cellule.

IFN γ regola l'espressione del recettore ad alta affinità Fc I (FcRI) sui fagociti.

IFN γ aumenta l'espressione di FcR sulle linee di cellule mononucleate umane (Naray-Fejes Toth e Guyre, 1984) e sulla piastrine (Pancré *et al.*, 1988). In considerazione del ruolo importante delle IgE nella resistenza alle malattie parassitarie e nelle reazioni allergiche di tipo I, tali effetti di IFN γ devono essere presi in considerazione quando si considera il ruolo di IFN γ in queste malattie.

IFN γ è tra le citochine capaci di accrescere l'espressione della molecola di adesione ICAM-1 su vari tipi di cellule, comprese cellule endoteliali e cheratinociti in coltura (Dustin *et al.*, 1988), con un conseguente aumento dell'adesività leucocitaria data da maggior espressione di integrina LFA-1.

Un'altra importante proteina di membrana indotta da IFN γ è l'antigene B7, il cui ligando sui linfociti T è la molecola CD28 (Freedman *et al.*, 1991). La presenza di B7 sulle cellule che presentano l'antigene è indispensabile per evitare loro di fornire uno segnale anergizzante (Harding *et al.*, 1992).

IFN γ è stato anche segnalato per aumentare l'espressione e la diffusione di antigeni tumore-associati da parte di cellule neoplastiche e in tal modo modulare per la loro individuazione da parte di anticorpi o linfociti T sensibilizzati (Greiner *et al.*, 1990) (**Fig. 2.16**).

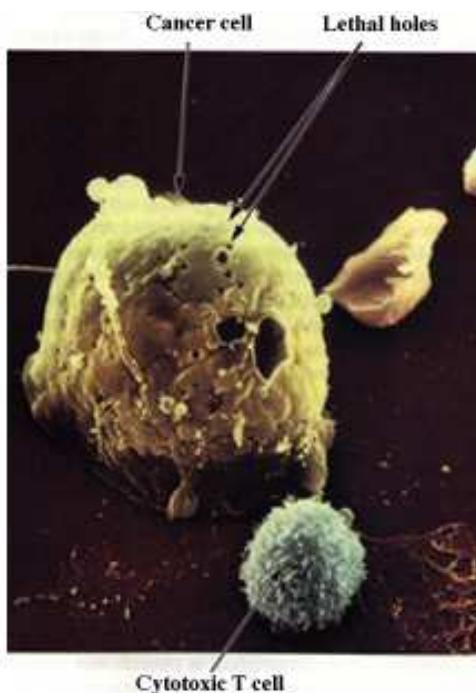


Figura 2.16 Attività antitumorale esercitata da un linfocita T citotossico (CTL) nei confronti di cellula neoplastica, attività modulata dall'IFN γ .

Considerando che, come regola generale, IFN γ aumenta l'espressione di molecole di membrana coinvolte nella risposta immunitaria, vi sono alcune eccezioni.

Esso inibisce l'espressione del ligando CD40 in cloni di linfociti CD4 + del fenotipo Th1 e Th2 di derivazione splenica (Roy *et al.*, 1993). IFN γ è stato anche segnalato inibire l'espressione di CD1A, CD80 e CD4 su cellule dendritiche mentre è in grado di potenziare l'espressione di altri antigeni di membrana in associazione ad una diminuzione della funzionalità di cellule APC (Rungcun *et al.*, 1998).

Anche l'espressione di selectina E e P indotta in seguito ad attivazione sulle cellule endoteliali umane in coltura è stata depressa (Melrose *et al.*, 1998). Questi effetti possono spiegare in parte il ruolo immunosoppressivo *in vivo* di IFN γ in alcuni sistemi.

IFN γ è da tempo riconosciuto come la prima importante citochina capace di attivare i macrofagi. 'Attivazione' è un termine usato indiscriminatamente, invece, che ha un senso solo se inserita in un contesto di una ben definita funzione o capacità funzionale, che è considerato. La popolazione di fagociti mononucleati, a cui appartengono i macrofagi, comprende cellule a diverse fasi di differenziazione e maturazione, cioè precursori del midollo osseo, monociti del sangue e diversi tipi di macrofagi tissutali (ad esempio, istiociti del tessuto connettivo, macrofagi alveolari, cellule del Kupffer, essudato di macrofagi, cellule della microglia, osteoclasti, ecc.) Queste fasi sono generalmente considerate come tappe di un processo che, anche se regolato da segnali ambientali, in sostanza, è irreversibile. Lo stato di attivazione dei macrofagi, di contro, è per lo più visto come un cambiamento reversibile determinato dal temporale cambiamento del microambiente a livello tissutale. IFN γ e altre citochine, essendo componenti del microambiente cellulare, svolgono un ruolo importante nella differenziazione e maturazione dei macrofagi tissutali.

I monociti circolanti, quando posti in coltura, vanno incontro ad apoptosi se non viene fornito loro alcun stimolo mediante LPS o altre citochine. Tipicamente, monociti ematici umani sopravvivono per più di 7 giorni, in presenza di M-CSF, ma, in sua assenza, essi muoiono entro 24 ore per apoptosi e necrosi secondaria. In presenza di M-CSF, il 100% dei monociti sopravvissuti diventano progressivamente resistenti contro il calo del fattore di crescita e possono essere attivati da esposizione ad uno stimolo per diventare biologicamente attivi come evidente dall'adesione, dall'attività fagocitaria e respiratoria. La presenza di M-CSF associato all'IFN γ permette l'instaurarsi di una resistenza alla sottrazione di citochine in tempi più brevi. Così, sebbene IFN γ non possa da solo sostituire l'M-CSF, esso può essere visto come un fattore in grado di agire in sinergia con M-CSF per evitare l'apoptosi e promuovere la maturazione dei macrofagi. Tuttavia è da sottolineare come monociti che hanno evitato l'apoptosi in presenza di M-CSF e IFN γ , al contrario di quelli che hanno maturato in presenza di solo M-CSF, vanno incontro ad apoptosi quando successivamente esposti ad uno stimolo di attivazione (Munn *et al.*, 1995).

Macrofagi attivati da IFN γ o altri agenti differiscono da quelli residenti per una maggiore capacità di endocitosi, manifesta con un aumento di pinocitosi e fagocitosi attraverso i recettori per il complemento e IgG2a. Tale capacità, tuttavia, non si applica a tutti i ligandi. L'espressione dei recettori Fc per le altre classi di immunoglobuline, per esempio, ha dimostrato di essere ridotta nello stato attivato. Ad esempio, macrofagi attivati da IFN γ sono stati riscontrati meno capaci di fagocitare una varietà di microrganismi intracellulari obbligati, quali ad esempio *Rickettsiae*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* amastigote (Mosser e Handman, 1992).

IFN γ regola la produzione di chemochine in macrofagi.

Si tratta di un potente induttore dell'espressione di mRNA codificante per γ IP-10 in macrofagi umani e murini (Luster *et al.*, 1985; Hamilton *et al.*, 1989). γ IP-10 appartiene alla famiglia chemochine. γ IP-10 umana ha dimostrato possedere attività chemoattrattive per monociti e cellule T attivati e di promuovere l'adesione dei linfociti T alle cellule endoteliali (Taub *et al.*, 1993). D'altro canto, è stato trovato che IFN γ sopprime l'espressione indotta da LPS di alcune chemochine in macrofagi peritoneali murini (Ohmori e Hamilton, 1994).

Allo stesso modo, l'induzione di IL-8 da parte di IL-2 o IL-1 in monociti umani è risultata essere inibita da IFN γ (Gusella *et al.*, 1993). Tuttavia, IFN γ non deve essere considerato come un inibitore dell'espressione di IL-8, in quanto agisce in sinergia con TNF per indurre IL-8 in altre cellule.

Le cellule endoteliali sono di particolare importanza nella risposta infiammatoria locale. IFN γ , così come IL-1 e TNF, aumentano la molecola di adesione ICAM-1 in colture di cellule endoteliali di origine cerebrale ed extracerebrale (Dustin *et al.*, 1993; McCarron *et al.*, 1993), determinando un'aumentata adesività dei leucociti esprimenti l'integrina LFA-1 (Yu *et al.*, 1985).

IFN γ inoltre migliora la capacità delle cellule endoteliali nel produrre IL-1 in risposta a LPS (Miossec e Ziff, 1986). Un effetto simile è stato osservato nelle colture di cellule sinoviali (Johnson *et al.*, 1990). IL-1, a sua volta, agisce come un induttore di altri mediatori infiammatori quali procoagulanti e prostaglandine.

Nonostante IFN γ possa agire come inibitore della proliferazione per la maggior parte di tipi cellulari, in generale esso stimola la proliferazione di linfociti T innescata dai mitogeni (Landolfo *et al.*, 1988).

In studi utilizzando cloni di linfociti T murini, si è riscontrato che IFN γ esercita un lieve effetto di soppressione nella proliferazione IL-2 e IL-4-mediata dei Th2, ma non dei cloni Th1 (Gajewski e Fitch, 1988).

Un aspetto nell'effetto regolatore di IFN γ sui linfociti è la sua capacità di promuovere l'apoptosi in specifiche condizioni. Infatti, il blocco di IFN γ inibisce la morte cellulare indotta in linfociti T effettori dal legame con TCR in assenza di cellule accessorie (Liu e Janeway, 1990). Inoltre, sia in colture di linfociti sani che maligni, IFN γ ha mostrato esercitare effetti contrastanti, ossia apoptosi o proliferazione, a seconda del livello di espressione dei recettori IFN γ : alti livelli di espressione sono associati ad una risposta apoptotica, bassi livelli di espressione con una condizione proliferativa (Novelli *et al.*, 1994).

IFN γ svolge un preciso ruolo nella differenziazione, *in vitro* e *in vivo* di popolazioni di linfociti T orientando la produzione di citochine verso risposte Th1.

Le citochine con il più alto impatto su tale differenziazione sono IL-12 e IL-4. IL-12 è un forte induttore di IFN γ e un promotore della risposta Th1. IL-4, invece, è un antagonista di IFN γ e un forte promotore di risposte Th2. Molti effetti di IL-12 hanno mostrato essere mediati da IFN γ . Di conseguenza, è possibile che IFN γ possa agire in questo processo come un mediatore di IL-12.

Le relazioni sugli effetti di IFN γ su cellule B sono un po' contraddittorie.

IFN γ è stato visto inibire la produzione di IgM LPS-indotta in cellule B di derivazione splenica, riducendo il numero di cellule che formano IgM e senza compromettere la proliferazione globale (Abed *et al.*, 1994b). In effetti, in cellule B, al contrario di cellule T, la fase di differenziazione sembra codeterminare il tipo di risposta a IFN γ . Linfociti B a riposo non

sembrano essere influenzati da IFN γ , mentre cellule B precedentemente attivate sono inibite nell'ulteriore differenziazione. Queste cellule mostrano anche aumentata espressione di recettori IFN γ (Abed *et al.*, 1994a, 1994b).

IFN γ è stato dimostrato stimolare la produzione di immunoglobuline policlonali di linfociti B a riposo o attivati mentre nelle colture di PBMC umani l'aggiunta di IFN γ promuove un anticorpo anti-IFN γ per inibire la produzione ritardata spontanea di IgG2 (Kawano *et al.*, 1994).

Gli effetti di IFN γ sull'ematopoiesi sono stati dimostrati in molti studi, utilizzando diverse impostazioni sperimentali, che invariabilmente impiegano uno o più fattori emopoietici o citochine.

Inoltre, IFN γ induce o aumenta la produzione di diverse altre citochine, pertanto i suoi effetti sull'ematopoiesi possono considerarsi anche di tipo indiretto. Per esempio, la chemochina γ IP-10 indotta dall'IFN γ ha dimostrato inibire la formazione di colonia da progenitori ematopoietici (Sarris *et al.*, 1993).

In colture cellulari di midollo osseo di topi normali IFN γ inibisce la crescita di colonie granulociti-macrofagiche. È stato suggerito come i progenitori richiedano il fattore delle cellule staminali nelle prime fasi e IFN γ per la successiva crescita (Shiohara *et al.*, 1993). Nel sistema umano IFN γ è stato dimostrato contrastare l'attività proliferativa di fattori stimolanti la colonia. Tuttavia anche nelle colture di cellule progenitrici CD34 +, IFN γ è stato trovato agire in sinergia con IL-3 (Caux *et al.*, 1992).

IFN γ di per sé non ha influenzato la proliferazione, e in presenza di IL-3, mentre era in grado di incrementare il numero di colonie, non ha inciso sulle loro dimensioni, il che indica che esso ha agito solo su primi progenitori.

In uno studio sul trapianto di midollo osseo umano, IFN γ e NO sono stati riscontrati sopprimere la formazione delle colonie, e il blocco farmacologico di NO potrebbe parzialmente impedire l'effetto soppressivo di IFN γ (Maciejewski *et al.*, 1995).

IFN γ è stato trovato sopprimere l'eritropoiesi sia *in vitro* e *in vivo*, un effetto che può giocare un ruolo nella anemia che accompagna le infezioni croniche o le malattie autoimmuni. Nel corso dell'eritropoiesi, IFN γ interagisce indubbiamente con una serie di altri fattori e citochine ematopoietiche. Studi sono stati volti a rivelare la più importante di queste interazioni al fine di comprendere le fasi più delicate dell'eritropoiesi.

L'aggiunta di IFN γ in colture cellulari derivanti da midollo osseo ha mostrato esercitare un effetto antagonizzante verso l'azione dell'eritropoietina (EPO), inibendo la formazione di colonie, un effetto invertito aumentando le concentrazioni di EPO (Wang *et al.*, 1995).

L'effetto di IFN γ non è stato impedito mediante aggiunta di anticorpi singoli o combinati contro il TNF, IL-1 o GM-CSF. Di conseguenza, un aumento della produzione di queste citochine in colture trattate con IFN γ o la sinergia di queste citochine con IFN γ non sembra giocare un ruolo significativo in corso di ematopoiesi.

I due tipi principali obiettivi per IFN γ nel sistema nervoso centrale (CNS) sono microglia e astrogli. Le cellule della microglia sono coinvolte in molte funzioni quali la presentazione dell'antigene, fagocitosi e l'attività citocida. Gli astrociti agiscono come regolatori dell'equilibrio ionico e nella regolare la liberazione dei neurotrasmettitori nel CNS. Quando coltivate *in vitro* queste cellule spontaneamente esprimono antigeni MHC.

L'esposizione a IFN γ migliora molto questa espressione. Tuttavia, in astrociti, al contrario di microglia, l'effetto di IFN γ può essere neutralizzata da vari fattori tra cui IFN α , IL-1, TGF β , glutammato e agonisti del cAMP.

Gli astrociti umani messi in coltura, spontaneamente esprimono antigeni MHC così come ICAM-1. Tuttavia questa espressione è notevolmente aumentata in presenza di IFN γ (Aloisi *et al.*, 1992).

Le cellule rispondono a IFN γ innescando uno stato di relativa resistenza al virus. I meccanismi molecolari e cellulari alla base di questa resistenza sono simili a quelli avviati da IFN α o IFN β .

Oltre ad esercitare effetti diretti sulla replicazione di HIV IFN γ potrebbe, in collaborazione con altre citochine, svolgere un ruolo tale da influenzare l'immunopatogenesi dell'AIDS.

In particolare, in corso di AIDS si ha una produzione aberrante di citochine conseguente all'infezione retrovirale in cui si assiste alla predominanza del profilo di citochine Th2 sul profilo di tipo Th1.

In linea con questo concetto è la constatazione che, in un modello murino di AIDS, la somministrazione di IFN γ insieme con anti-IL-4 ritarda lo sviluppo di anticorpi e le manifestazioni della malattia (Wang *et al.*, 1994).

I *Poxvirus* di diverse specie animali, essendosi coevoluti sotto la pressione antivirale mediata da IFN γ esercitata dal sistema immunitario dell'organismo ospite, hanno acquisito le informazioni genetiche per indurre cellule infette a produrre antagonisti solubili per i recettori dell'IFN γ .

Un esempio è il *myxomavirus* del coniglio. Le cellule infettate con tale virus rilasciano una proteina che legandosi all'IFN γ del coniglio va ad inibire la sua attività biologica. La reattività è risultata essere specie-specifica (Upton *et al.*, 1995). I poxvirus esprimono anche proteine che interferiscono con l'attività biologica di citochine diverse dall'IFN γ , in particolare IL-1 e TNF.

Virus mutanti che perdono la capacità di produrre queste proteine replicano normalmente nelle cellule *in vitro*, ma tendono ad essere attenuati *in vivo* (Gooding, 1992).

Molti casi sono stati segnalati nei quali IFN γ agisce in sinergia con TNF sia *in vitro* o *in vivo*: la citotossicità *in vitro* per alcune cellule tumorali, l'induzione di attività microbica in macrofagi, l'induzione del rilascio di NO da parte di vari tipi di cellule, l'espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare, gli effetti antitumorali *in vivo*, l'induzione di altre citochine, tossicità sistemica e letalità.

Il meccanismo subcellulare alla base di questa sinergia sono poco compresi. IFN γ ha mostrato aumentare l'espressione da alcuni recettori per TNF in determinate linee cellulari (Ruggiero *et al.*, 1986). Tuttavia, questa non è la regola generale e non è in grado di spiegare tutti gli effetti sinergici descritti. In macrofagi murini prelevati dal peritoneo IFN γ , quando aggiunto ad alte concentrazioni, è stata trovata inibire anziché migliorare espressione di recettori TNF: in macrofagi appena prelevati esso impediva la comparsa di recettori, e in macrofagi maturi determinava un decremento dei recettori già espressi (Drapier *et al.*, 1991).

Questo effetto inibitorio non è stato ritenuto in contrasto con la sinergia tra TNF e IFN γ , in quanto questo tipo di sinergia è stato visto solo a dosi inferiori di IFN γ .

Questa differenza dose-dipendente di interazione tra le due citochine può essere di particolare importanza per l'interpretazione di effetti spesso contraddittori di entrambe le citochine infiammatorie visti in modelli *in vivo*.

In diversi sistemi IL-4 e IFN γ sono stati trovati esercitare effetti opposti e antagonizzarsi a vicenda quando presenti entrambi. Tipici effetti di IFN γ su monociti e macrofagi (induzione di geni IFN γ -reattivi, produzione di H₂O₂, attività intracellulare antimicrobica) sono neutralizzati da IL-4 (Gaspari *et al.*, 1988; Gautam *et al.*, 1992), anche se è stata anche segnalata la sinergia (Belosevic *et al.*, 1988).

IL-4 inibisce l'induzione di chemochine indotte dall'IFN γ (Larner *et al.*, 1993; Marfaing-Kok *et al.*, 1995).

Viceversa, tipiche azioni dell'IL-4 sui linfociti B (isotype switch in favore di IgE) e linfociti T (inibizione della proliferazione dei timociti) sono neutralizzate dall'IFN γ (Plum *et al.*, 1991). IL-4, infine, antagonizza IFN γ inibendo la produzione di cellule mononucleate del sangue periferico (Vercelli *et al.*, 1990).

Il meccanismo subcellulare di antagonismo tra IFN γ e IL-4 in monociti comporta l'inibizione di IL-4 a livello trascrizionale di attivazione delle proteine IFN γ -inducibili, come è stato dimostrato essere il caso per la chemochina γ IP-10. L'obiettivo fissato per l'inibizione sembra essere il ISRE (elemento di risposta interferone-sensibile) e il promotore del gene IP-10 (Larner *et al.*, 1993).

La produzione di IFN γ -stimolata da antigene cellule T CD4 + dipende dalla presenza di IL-2, sia durante il reclutamento sia nella fase di espressione. Al contrario, la produzione di IL-4 richiede IL-2 solo durante la fase di reclutamento. Questa differenza fra la produzione IL-4 e IFN γ può essere parte del meccanismo capace di dirigere la risposta immunitaria verso un predominio TH1 o TH2.

Interferoni di tipo I (α e β) contrastano l'induzione di IFN γ di antigeni MHC di classe II in macrofagi murini (Ling *et al.*, 1985; Fertsch *et al.*, 1987). L'effetto antagonista è stato anche osservato in colture di astrociti umani (Barna *et al.*, 1989) e cellule di astrocitoma, ma non in monociti umani (Ransohoff *et al.*, 1991).

Come documentato da esperimenti eseguiti a livello nucleare, l'effetto antagonista è esercitato a livello trascrizionale (Ransohoff *et al.*, 1991).

Sebbene IL-10, come tutte le citochine, possiede molteplici attività biologiche, il suo effetto principale è legato alla capacità di inibire la sintesi di IFN γ inibendo anche la produzione di ossido di azoto indotta da IFN γ (Gazinelli *et al.*, 1992). Il potente effetto inibitorio di IL-10 sulla produzione di IFN γ viene constatato dalla somministrazione di IL-10 capace di inibire gli effetti indotti da enterotossina stafilococcica B (SEB) (Florquin *et al.*, 1994).

L'effetto antagonista di IL-10 su IFN γ è reciproco. La produzione IL-10 in monociti è inibita da IFN γ (Chomarat *et al.*, 1993). Sembra probabile, quindi, che l'equilibrio tra IL-10 e IFN γ nelle prime fasi di una risposta immunitaria sia di importanza cruciale per determinare l'ulteriore corso della risposta. Per esempio, la stimolazione selettiva della produzione di IL-10 è stata proposta come una strategia utilizzata da alcuni microrganismi, in particolare elminti e protozoi nel sottrarsi alle difese dell'ospite IFN γ -mediate.

TNF agisce in sinergia con IFN γ in molti sistemi di test *in vitro*; tuttavia, questa non è affatto una regola generale. Per quanto riguarda le due importanti attività, l'espressione di molecole MHC di classe II e di recettori Fc, la combinazione di IFN γ e TNF è stata riportata essere meno attiva rispetto alla somministrazione di singole citochine (Zimmer e Jones, 1990; Loughlin *et al.*, 1992).

In realtà, se IFN γ e TNF agiscono in sinergia o antagonizzandosi dipendentemente dallo stato di differenziazione delle cellule. Così, il TNF è stato trovato migliorare l'espressione di MHC di classe II indotta da IFN γ in macrofagi indifferenziati ma di inibire tale espressione in macrofagi maturi (Watanabe *et al.*, 1991).

IL-6 è stato trovato agire come antagonista nei riguardi dell'attività toxoplasmacida di IFN γ in macrofagi peritoneali murini *in vitro*. La combinazione con TNF nel pretrattamento effettuato con IL-6 determina nuovamente il ristabilirsi dell'attività toxoplasmacida (Beaman *et al.*, 1994)

Attività *in vivo*

IFN γ è generalmente assunto svolgere un ruolo primordiale nella difesa contro gli agenti patogeni che risiedono a livello intracellulare e che utilizzano tale ambiente come scudo contro anticorpi microbici.

La specifica difesa che l'ospite deve attuare nei confronti di questi organismi è pertanto legata a meccanismi di immunità cellulare. Molti di questi agenti patogeni hanno il loro habitat in fagociti mononucleati.

La visione tradizionale vuole che linfociti T helper CD4 + capaci di riconoscere l'antigene microbico espresso su MHC II dei fagociti infetti vengano attivati per produrre citochine, IFN γ compreso. Questo IFN γ innesca quindi dei meccanismi microbicidi diversi nel fagocita, quali ad esempio, la triptofano-ossidasi e reattivi di ossigeno e azoto. Va notato, tuttavia che questo percorso citochine-dipendente è completato dall'attività citotossica delle cellule T, che uccidono fagociti o altre cellule che albergano microrganismi patogeni (Ottenhof *et Mutis*, 1995).

In una grande varietà di modelli *in vivo* per le malattie infettive IFN γ è stata dimostrata influenzare l'esito di infezione sperimentale. I due principali approcci utilizzati in questi studi sono stati di dimostrare alterazioni nel corso di infezione sotto l'influenza di IFN γ esogeno, o viceversa, un effetto di blocco dell'IFN γ endogeno con la somministrazione di anticorpi neutralizzanti anti-IFN γ . Questi dati sono stati confermati mediante l'uso di topi, che sono stati progettati per essere deficienti nella produzione di IFN γ (knockout) o nell'espressione del recettore per IFN γ .

I meccanismi cellulari o fisiologici attraverso i quali IFN γ esercita le sue vantaggiose attività sono diverse. Una riduzione nel legame fra parassita e cellula ospite è stato descritto come possibile meccanismo in corso di *Leishmaniosi* (Mosser e Handman, 1992). La ridotta disponibilità di triptofano, determinata da una maggiore produzione di indoleammine ossidasi indotta da IFN γ , è stato individuato come un meccanismo di riduzione della crescita intracellulare di *Toxoplasma* (Murray *et al.*, 1989).

L'uccisione di organismi intracellulari mediante la generazione di perossido d'ossigeno è stato segnalata come un meccanismo coinvolto nell'uccisione di *Listeria* (Peck, 1989) e *Salmonella* (Kagaya *et al.*, 1989) in macrofagi attivati da IFN γ .

La produzione di NO IFN γ -mediata contribuisce ad eliminare *Trypanosoma cruzi* (Mayer *et al.*, 1993), *Mycobacterium tuberculosis* (Flynn *et al.*, 1993), e *Histoplasma capsulatum* (Nakamura *et al.*, 1994). Va notato, tuttavia, che almeno alcuni macrofagi attivati da IFN γ possono uccidere la *Listeria* attraverso un meccanismo indipendente da reattivi dell'azoto (Leenen *et al.*, 1994).

La produzione di IFN γ da parte di cellule NK nelle fasi iniziali di infezioni batteriche o da protozoi è ora generalmente accettata costituire un elemento fondamentale di difesa in quanto genera una resistenza transitoria aspecifica. Per esempio, la resistenza temporanea dipendente da IFN γ di topi infettati con *Toxoplasma* è risultata dalla stimolazione dei linfociti CD4-CD8- (Johnson *et al.*, 1993). Non inaspettatamente, topi knockout per IFN γ soccombono rapidamente per infezione con ceppi di *Toxoplasma* altrimenti avirulenti. In questi topi la neutralizzazione di IL-12 da parte di anticorpi bloccano l'attività delle cellule NK, ma non riducono ulteriormente la resistenza alle infezioni, il che suggerisce come una prima resistenza sia mediata dall'IFN γ (Scharton *et al.*, 1996). La produzione di IFN γ in questa prima resistenza può essere attribuibile non solo a cellule NK, ma può anche includere linfociti T CD4 + (Scharton-Kersten *et al.*, 1998).

Un altro tipo di meccanismo in cui viene coinvolta la produzione di IFN γ è l'equilibrio che si viene ad instaurare fra sottopopolazione linfocitaria Th1 e Th2.

Una singola somministrazione di anticorpi anti-IFN γ prima di una infezione sperimentale da *leishmaniosi* nei topi promuove la suscettibilità (Belosevic *et al.*, 1989), e inibisce lo sviluppo di cellule Th1 (Scott, 1991). Viceversa, l'iniezione di IFN γ nei primi stadi di infezione indirizza verso la produzione di citochine da un profilo Th2 a un profilo Th1 in topi sensibili (Scott, 1991). I produttori di IFN γ nelle fasi iniziali di in questo modello sono stati riscontrati essere le cellule NK (Scharton e Scott, 1993).

Topi knock out per il recettore di IFN γ , sono stati trovati essere maggiormente sensibili alle infezioni, ma comunque in grado di organizzare un tipo di risposta Th1 (Swihart *et al.*, 1995).

L'infezione da *Listeria* è un altro esempio: il trattamento di topi con anticorpi neutralizzanti anti-IFN γ ha ritardato eliminazione di batteri da milza e fegato e ha portato ad un aumento della produzione di IL-4 e IL-10 circolanti (citochine Th2), in ritardo di infezione. Tuttavia, il trattamento aggiuntivo con anticorpo anti-IL-4 ha restaurato la resistenza, suggerendo che l'IFN γ endogeno è necessario per evitare una risposta Th2 (Nakane *et al.*, 1996).

Sorprendentemente, vi sono poche eccezioni alla regola generale per cui IFN γ endogeno eserciti un effetto benefico in corso di infezioni. Queste eccezioni possono essere suddivise in due categorie: l'adeguamento dell'agente microbico e la sovrapproduzione di citochine.

Alcuni agenti sembrano essersi adattati molto bene al sistema immunitario del soggetto ospitante, essendo riusciti a modulare l'espressione di citochine tale per cui IFN γ agisca a loro vantaggio. Le infezioni da *Trypanosoma* nei roditori esemplificano tale effetto di IFN γ da parte del parassita. Queste infezioni, in generale, sono associate ad una immunosoppressione non specifica coinvolgenti vari meccanismi.

Infatti, nel caso di infezioni sostenute da *T. brucei* e *T. congolense*, la produzione di IFN γ è un elemento fondamentale nella creazione dell'immunosoppressione; i linfociti infettati da *T. brucei* sono incapaci di esprimere IL-2 dopo stimolazione antigenica e conseguente incapacità a proliferare mentre veniva mantenuta una normale produzione di IFN γ (Sileghem *et al.*, 1987; Darji *et al.*, 1993).

Una risposta proliferativa è stato osservata nel momento in cui si è andati a bloccare l'IFN γ endogeno mediante anticorpi. Così, IFN γ può agire come diretto fattore di crescita per il parassita.

L'effetto immunosoppressivo di IFN γ in corso di infezione da *T. congolense* è illustrato dalla constatazione che il trattamento con anticorpi anti-IFN γ protegge i topi dall'infezione (Uzonna *et al.*, 1998).

Altri due agenti che, almeno in determinati sistemi *in vitro*, crescono meglio in presenza che in assenza di IFN γ sono *Mycobacterium lepraemurium* (Mor *et al.*, 1989) e *Candida albicans* (Garner *et al.*, 1989).

La sovrapproduzione di IFN γ , in associazione con quella di altre citochine, è in grado di agire a danno dell'organismo in due diversi modi:

- l'IFN γ può aumentare la produzione di altre citochine, ad esempio TNF, che possono causare danni ai tessuti fino addirittura alla morte;
- l'IFN γ può agire in sinergia con queste citochine.

Lo shock causato in topi da endotossina è aggravata dalla somministrazione di IFN γ . Pertanto, il trattamento con anticorpi neutralizzanti contro IFN γ protegge i topi contro l'induzione di una

reazione generalizzata di Shwartzman letale, e questo effetto protettivo è associato a livelli sierici di TNF e IFN γ più bassi (Heremans *et al.*, 1990; Billiau et Vandekerckhove, 1991).

Infezioni croniche sono spesso accompagnate da cachessia. La sovrapproduzione di citochine, in particolare del TNF (*cachessina*), è stato incriminato come un elemento importante nella patogenesi della cachessia che si sviluppa in associazione con il cancro (Tracey *et al.*, 1988; Sherry *et al.*, 1989). Tuttavia, almeno nei modelli tumorali in ratti e topi, la cachessia ha dimostrato essere riconducibile molto più all'effetto dell'IFN γ piuttosto che al TNF (Langstein *et al.*, 1991; Billiau et Matthys, 1992).

IFN γ ha il ruolo di proteggere contro virus, in virtù del suo effetto antivirale diretto sulla maggior parte dei tipi di cellule e di regolamentazione per la sua attività sugli immunociti. Non inaspettatamente, IFN γ somministrato per via esogena è stato trovato agire nella profilassi contro una varietà di infezioni da virus sperimentali (Fennie *et al.*, 1988; Haagmans *et al.*, 1994).

Generalmente questi studi hanno indicato che l'IFN γ endogeno è essenziale per una adeguata difesa contro virus, vale a dire per la eliminazione del virus a seguito di infezione primaria e, in alcuni casi, anche per la realizzazione di adeguate immunità contro la reinfezione. Tuttavia, una questione che rimane in gran parte irrisolta è se gli effetti antivirali di IFN γ endogeno in vivo sono dovuti alla sua diretta attività antivirale sulle cellule o per la sua attività immunomodulante, come ad esempio l'attivazione di cellule NK o maturazione dei linfociti T citotossici.

Nei topi infettati con murino citomegalovirus (CMV), la clearance del virus da ghiandole salivari è stato dimostrato dipendere da IFN γ endogeno (Lucin *et al.*, 1992). I topi infettati con CMV murino presentano macrofagi attivati con un aumento dell'espressione genica di MHC e ICAM-1. Il trattamento con anticorpi anti-IFN γ impedisce che tale attivazione si verifichi, il virus si replica in milza e fegato con un tasso replicativo più elevato determinando un'aptologia più conclamata (Heise e Virgin, 1995).

Nei topi infettati a livello plantare da poxvirus murino (*ectromeliavirus*), il trattamento con anticorpi anti-IFN γ si è tradotto in una maggiore diffusione del virus ed una replicazione in milza, polmoni, ovaie e, in particolare, fegato (Karupiah *et al.*, 1993a). Allo stesso modo, la neutralizzazione di IFN γ endogeno ha portato ad una più elevata mortalità nei topi infettati con *herpesvirus* umani (Stanton *et al.*, 1995).

Osservazioni discordanti emergono dagli studi in cui viene valutato l'effetto di IFN γ nel potenziale metastatico o di crescita in tumori sperimentali.

Topi deficienti nell'espressione del recettore per IFN γ così come STAT1-deficienti sono stati trovati sviluppare tumori indotti da metilcolantrene più rapidamente e con maggiore frequenza rispetto a topi normali. Allo stesso modo, l'inattivazione di p53 anti-oncogene ha determinato un numero più grande e una più ampia varietà di tumori in questi topi. Da esperimenti con trapianto di cellule da tumori indotti da agenti cancerogeni in topi IFN γ -insensibili, sembra che IFN γ agisca almeno in parte nell'aumentare l'immunogenicità delle cellule tumorali (Kaplan *et al.*, 1998)

Cellule di carcinoma mammario metastatizzante murino, transfettate con il gene IFN γ si sono mostrate in grado di dare metastasi in maniera più estesa rispetto a cellule tumorali non transfettate (Ferrantini *et al.*, 1994). Il trattamento *in vitro* di cellule di carcinoma con IFN γ prima della loro inoculazione in topi è stato segnalato rafforzare il potenziale metastatico (Ramani and Balkwill, 1987), il meccanismo coinvolto in questo modello sembra essere un

aumento di resistenza all'attività citolitica di cellule NK indotto dall'IFN γ nelle cellule tumorali.

IFN γ aumenta inoltre l'espressione di MHC di classe II e può quindi essere ritenuto facilitare l'induzione di anticorpi in sistemi di presentazione in cui l'antigene risulti essere il fattore limitante.

IFN γ e IL-4 si antagonizzano a vicenda in una varietà di sistemi, ed è ormai noto che le risposte anticorpali dipendono dall'equilibrio che si viene ad instaurare tra le due categorie di citochine, IFN γ e IL-2 appartenenti al profilo Th1 mentre IL-4, IL-5 e IL-10 appartenenti al profilo Th2. In tale contesto, il ruolo di IFN γ consiste nel sopprimere la formazione di anticorpi IgG1 e IgE e stimolare la formazione di anticorpi IgG2a (Snapper *et al.*, 1993). A seguito di infezione da virus influenzali (Graham *et al.*, 1993), la risposta IgG1 virus-specifica è risultata essere significativamente più alta in topi IFN γ -deficienti rispetto a topi normali, che riflette probabilmente un aumento della produzione di IL-4. Il trattamento con anticorpi neutralizzanti anti-IFN γ nei topi vaccinati con antigeni del virus influenzale ha determinato l'aumento dei livelli di antigene specifico IgG1 e IgE, ma ridotto i livelli di IgG2 e IgG3 (Dobber *et al.*, 1995). In topi knockout per il recettore dell'IFN γ , la risposta anticorpale IgG1 all'ovoalbumina non è stato diverso da quello in topi normali, ma la risposta anticorpale mediata da isotipi IgG2a è stata ridotta (Huang *et al.*, 1993).

Quando viene iniettato l'antigene in adiuvante, un evento molto precoce è la comparsa nel sito di iniezione di cellule NK in grado di produrre IFN γ . Solo più tardi si ha la comparsa di linfociti T coinvolti nella produzione di citochine nei linfonodi drenanti. In questo sito IL-2 e IL-4 prevalgono sull'IFN γ (Bogen *et al.*, 1993). Si è considerata l'ipotesi che la produzione di IFN γ da parte delle cellule NK è, in realtà, secondaria alla produzione di IL-12 da parte dei macrofagi, che rispondono all'antigene o all'adiuvante. Una precoce produzione di IL-12 e IFN γ può quindi svolgere un ruolo cruciale nel dirigere la risposta immunitaria verso un predominio Th1 o Th2.

Le risposte predominanti di leucociti e cellule endoteliali all'IFN γ (maggiore espressione di molecole MHC e di adesione, e produzione di altre citochine quali IL-1, TNF e IL-12) sono tali per cui l'IFN γ viene generalmente classificato quale immunostimolante. Eppure, ci sono numerose relazioni sperimentali *in vivo* o *ex vivo* in cui a sistemi di produzione più elevati di IFN γ è associata una minore reattività ad antigeni o mitogeni.

Un esempio in cui IFN γ media una immunosoppressione generalizzata è l'infezione da *Trypanosoma brucei* nei topi come visto in precedenza (Darji *et al.*, 1993). Questa attività soppressiva è stata accompagnata da diminuita espressione di recettori IL-2 ma da un aumento della produzione di IFN γ . L'aggiunta di anticorpi anti-IFN γ ha impedito la soppressione della risposta mitogena e l'espressione del recettore per IL-2; ciò implica che l'IFN γ è stato determinante nell'attività soppressiva.

Infine, IFN γ sembra essere in grado di reclutare i linfociti soppressori nelle reazioni di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH). Cellule aderenti spleniche incubate con aptene e quindi iniettate in topi sono stati trovati sopprimere la DTH e indurre la comparsa di linfociti soppressori aptene-specifici, dimostrabili mediante trasferimento in topi successivamente testati per la reattività DTH.

In seguito a prolungata coltura le cellule spleniche hanno perso la loro capacità di indurre la soppressione, ma l'aggiunta di IFN γ era in grado di ripristinare questa capacità (Noma e Dorf, 1985).

Boraschi *et al.* (1984) hanno rilevato che IFN γ riduce piuttosto che stimola l'attività soppressiva di macrofagi murini inibendo il rilascio di PGE₂.

Un altro percorso utilizzato da soppressori dei macrofagi, che può essere attivato da IFN γ , è la produzione di ossido nitrico (Albina *et al.*, 1991).

IFN γ , migliora anche il rilascio di TGF da parte di fagociti mononucleati (Twardzik *et al.*, 1990), che è generalmente conosciuto come una citochina anti-infiammatoria. Un altro meccanismo di immunosoppressione esercitato dall'IFN γ è dato dall'inibizione dell'espressione del ligando CD40 (Roy *et al.*, 1993). Altri meccanismi di immunosoppressione esercitati dall'IFN γ includono gli effetti inibitori sull'espressione di molecole associate a membrana e sulla produzione di chemochine.

L'applicazione di diversi metodi ha documentato la produzione di IFN γ in organi linfoidei e in siti di infiammazione locale, quale ad esempio, nel SNC durante l'encefalomielite autoimmune sperimentale (Heremans et Billiau, 1997). Tuttavia, una maggior comprensione del ruolo svolto dall'IFN γ nell'infiammazione deriva da esperimenti in cui si ricorre all'uso di anticorpi monoclonali per neutralizzare IFN γ *in vivo*, e da esperimenti che prevedono l'uso di topi knockout per l'IFN γ ligando o del suo recettore; in entrambi i casi si ha una assenza dell'azione esercitata da tale proteina.

Un modello di infiammazione locale è la reazione di Shwartzman suscitata da una singola iniezione di endotossina nel polpastrello murino (Heremans *et al.*, 1987). Il pretrattamento di topi con anticorpi monoclonali diretti verso IFN γ determina una modifica della reazione di gonfiore del polpastrello: inizialmente l'edema viene ridotto, mentre la successiva fase, che consiste nell'infiltrazione cellulare e nella trombosi intravascolare, rimane in gran parte invariata.

Questo risultato indica che IFN γ prodotto successivamente allo stimolo infiammatorio esercita un effetto di flogosi locale. Tuttavia, non è chiaro se questo IFN γ proviene da una fonte locale (NK o cellule T nel polpastrello) o ha avuto la sua origine a livello splenico o linfonodale.

L'iniezione locale di endotossina molto probabilmente è sufficiente per indurre una risposta citochinica generalizzata, come è stato rilevato indurre una reazione generalizzata di Shwartzman attraverso una seconda iniezione sistemica di endotossina (Heremans *et al.*, 1990).

Sorprendentemente, il pretrattamento dei topi con IFN γ esogeno, invece di aumentare la reazione locale la inibisce. Una possibile interpretazione è che l'effetto di IFN γ differisca a seconda se esso colpisce temporalmente prima o successivamente all'iniezione di endotossina.

Gli effetti contrapposti esercitati dall'IFN γ a seconda del momento di entrata nel sistema è un tema ricorrente negli studi con modelli animali.

Modelli di infiammazioni acute generalizzate sono divenute tipici sistemi di valutazione per gli effetti esercitati da IFN γ .

Uno dei primi modelli ad essere stato studiato ha previsto la valutazione dell'effetto letale in corso di flogosi generalizzata determinata dall'inoculazione di endotossina. Il pretrattamento di topi con anticorpi anti-IFN γ è stata riscontrato rendere completamente resistenti i topi alla reazione generalizzata di Shwartzman. Questa resistenza sembra essere correlato ad una ridotta produzione sistemica di TNF (Heremans *et al.*, 1990).

Di particolare interesse è la sindrome di anti-CD3 perché i risultati ottenuti mediante uso di anticorpi verso IFN γ sono stati contraddetti dai risultati di esperimenti con i topi knockout. La molecola di membrana CD3 è presente su tutte i linfociti T. L'iniezione di anticorpi avvia una risposta di tutti i linfociti T, e la conseguente massiccia produzione di diverse citochine

comprese non solo IFN γ , ma anche di IL-2, IL-4, TNF, etc. Il risultato è una sindrome simil-shock caratterizzata da ipomotilità e piloerezione, ipotermia e ipoglicemia. A seconda della sensibilità intrinseca dei topi e sulla dose di anticorpo, la sindrome può essere controllata o letali.

Il pretrattamento dei topi con anticorpi anti-IFN γ prima dell'iniezione di anticorpi anti-CD3 ha fornito una protezione completa contro le manifestazioni di malattia (Matthys *et al.*, 1993).

Studi con topi knockout per il recettore per IFN γ , tuttavia, hanno fornito risultati che portano ad una conclusione diversa (Matthys *et al.*, 1995a); topi knockout per il recettore IFN γ R si sono rivelati più sensibile all'iniezione di anti CD3, il che indica che, in questa situazione, vi è un meccanismo IFN γ -dipendente di protezione.

Altri modelli di infiammazione acuta in cui l'approccio anticorpale ha portato alla dimostrazione dell'effetto proinfiammatorio esercitato da IFN γ sono le sindromi da shock superantigene-indotte (Matthys *et al.*, 1995b), le sindrome indotte dall'anticorpo anti-CD3 (Matthys *et al.*, 1993), cachessie tumore-associate (Matthys *et al.*, 1991a, 1991b) e la sindrome letale da epatite indotta da concanavalina (ConA) (Tagawa *et al.*, 1997). In ciascuno di questi casi, il pretrattamento con anticorpi anti-IFN γ proteggeva gli animali contro le sostanze tossiche liberate dalla reazione infiammatorie.

Il trattamento di topi riceventi pelle allogenica con anticorpi anti-IFN γ è stato trovato posticipare il rifiuto se il trapianto è MHC di classe II-antigene incompatibile, ma non se è solo MHC di classe I-incompatibile (Rosenberg *et al.*, 1990), suggerendo che se l'IFN γ endogeno contribuisce al rifiuto di una pelle allogenica, lo fa perché induce l'espressione di complessi maggiori di istocompatibilità di classe II sui cheratinociti. Recenti prove di rigetto allogenico hanno mostrato un effetto soppressivo dell'IFN γ endogeno. Il tasso di rigetto trapianti cardiaci è risultato essere simile nei topi knockout per il gene IFN γ e nei tipi *wild type* (Konieczny *et al.*, 1998). E' stato ipotizzato come l'IFN γ eserciti un effetto soppressivo in presenza di una inadeguata costimolazione (Saleem *et al.*, 1996).

L'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) e l'uveite autoimmune sperimentale (EAU) nei topi sono due esempi in cui vi è un netto effetto di immunosoppressione da parte dell'IFN γ endogeno prodotto nel corso del processo immunitario.

In molti modelli di malattia, il trattamento dei topi con anticorpi neutralizzanti contro IFN γ ha determinato un aumento dei sintomi e un'aumentata mortalità (Billiau, 1996b). Inoltre, topi knockout sia per il recettore di IFN γ sia per IFN γ ligando sono stati trovati essere più sensibili all'induzione di EAE rispetto ai loro omologhi di tipo naturale *wild type* (Ferber *et al.*, 1996; Heremans *et al.*, 1996a).

Esempi di modelli in cui l'IFN γ accelera o intensifica la patologia immunitaria sono il diabete autoimmune, la sindrome simil-lupus in topi e la malattia infiammatoria cronica intestinale.

Le relazioni riguardo al ruolo dell'IFN γ in modelli di diabete autoimmune sono controverse. Il diabete indotto da streptozotocina, valutando parametri quali iperglicemia e calo ponderale, è stato riscontrato essere più grave nei topi che avevano ricevuto in associazione anche iniezioni di IFN γ (Campbell *et al.*, 1988).

Il pretrattamento con anticorpi anti-IFN γ è stato visto ridurre l'incidenza e la gravità del diabete in topi diabetici non obesi in cui si assisteva ad un aumento dell'insorgenza di diabete in seguito a somministrazione di ciclofosfamide (Debraye-Sachs *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1991a).

Contrariamente a quanto atteso, la somministrazione di IFN γ in questo modello murino di diabete non ha influenzato i profili di glucosio nel sangue. In realtà, in combinazione con il TNF, il trattamento con IFN γ è stato associato ad una riduzione della gravità

dell'infiammazione a carico delle isole pancreatiche, anche se questo trattamento causava una pancreatite da moderata a grave e alcuni altri effetti collaterali (Campbell *et al.*, 1991b).

Quindi, alla luce degli studi attuali, sembra che l'IFN γ endogeno favorisca l'insorgenza di diabete autoimmune.

I meccanismi di base sono considerati essere una *up regulation* di molecole MHC di classe I, il che potrebbe aumentare il targeting dei linfociti T citotossici verso le isole pancreatiche produttrici di insulina, e un aumento della produzione di mediatori infiammatori aspecifici, quali ad esempio NO.

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD), sono ad oggi considerate come disturbi nel delicato equilibrio tra anergia e reattività immunitaria verso antigeni e tossine microbiche presenti nel lume intestinale.

I risultati ottenuti fanno pensare che l'IFN γ endogeno rivesta un ruolo nel promuovere la malattia.

I topi knockout per IFN γ sono stati trovati essere resistenti alla enteropatia dell'intestino tenue indotta da IL-12 e la somministrazione di IFN γ esogeno è stato riscontrato essere in grado da solo di causare danni epiteliali della mucosa (Guy-Grand *et al.*, 1998), il che indica che linfociti intraepiteliali producono IFN γ attribuendo a queste un effetto citotossico diretto sulle cellule epiteliali stesse. Così, in IBD, IFN γ sembra agire più per il suo potenziale infiammatorio che per gli effetti immunoregulatori.

Nell'artrite collagene-indotta, il trattamento con anticorpi anti-IFN γ è stato segnalato inibire o rafforzare una malattia, a seconda del tempo di somministrazione (Boissier *et al.*, 1995). Tuttavia, studi più recenti hanno fornito prove di un modello uniforme di effetti aggravanti la malattia, come evidente da una accelerata comparsa dei sintomi e una più alta incidenza cumulativa (Williams *et al.*, 1993; Vermeire *et al.*, 1997; Manoury-Schwarz *et al.*, 1997). Inoltre, topi knockout per il recettore IFN γ sono stati trovati essere più sensibili di tipi *wild type* (Vermeire *et al.*, 1997; Manoury-Schwarz *et al.*, 1997).

L'associazione fra elevati livelli di IgE e squilibrio fra IL-4 e IFN γ è stato suggerito essere coinvolti nella patogenesi della cosiddetta sindrome da iper-IgE (HIE) (King *et al.*, 1989), nella dermatite atopica o nelle infezioni da elminti.

In corso di HIE, l'aumento della produzione di IL-4, non è stato confermato. Viceversa, molti ma non tutti gli studi, riportano una diminuita produzione di IFN γ .

La produzione di IL-4 determinata da mitogeni in PBMC di soggetti atopici è stata riscontrata più elevata e la produzione di IFN γ inferiore a quella di PBMC di soggetti normali (Rousset *et al.*, 1991).

Nei pazienti con infestazioni da elminti, i livelli di IgE sono stati riscontrati in correlazione con l'aumento di IL-4 e una diminuita produzione di IFN γ da parte di linfociti stimolati con antigeni parassitari (King *et al.*, 1993).

Tuttavia, in uno studio controllato con placebo, l'IFN γ esogeno non alterava i parametri clinici o i livelli di IgE nei pazienti con febbre da fieno tipo rinite allergica (Li *et al.*, 1990). Di contro, in un modello murino per la sensibilizzazione ad allergeni, l'IFN γ nebulizzato ha mostrato diminuire la produzione di IgE e normalizzare la funzione delle vie aeree (Lack *et al.*, 1994).

Elevati livelli di IgE sono tra le caratteristiche immunologiche dell'eczema atopico cronico. La risposta ad IFN γ è risultata essere difettosa in questi pazienti (Reinhold *et al.*, 1990). Tuttavia, ci sono anche altri cambiamenti quali diminuite reazioni di ipersensibilità ritardata, diminuita reattività *in vitro* ai mitogeni e ai richiami con gli antigeni e una diminuzione del numero di linfociti T CD8⁺.

Terapia

La malattia granulomatosa cronica (CGD) è il nome di un gruppo di malattie ereditarie a carico dell'enzima NADPH ossidasi, che è essenziale per la produzione di superossido e relativi prodotti intermedi dell'ossigeno da parte dei fagociti. I fagociti di pazienti affetti da CGD sono in grado di ingerire batteri normalmente ma non riescono a ucciderli in modo efficace. I pazienti soffrono di gravi e ricorrenti infezioni purulente che iniziano nei primi mesi di vita e possono portare alla morte. Il pretrattamento di fagociti con IFN γ aumenta il *burst respiratorio* innescato da altri stimoli quali LPS: pertanto si ritiene che l'IFN γ sia in grado di regolare la trascrizione dei geni codificanti per gli enzimi del sistema NADPH ossidasi (Ahlin *et al.*, 1997).

La leishmaniosi viscerale, causata principalmente da *Leishmania donovani*, è una grave malattia, caratterizzata da febbre, epatosplenomegalia, anemia e leucopenia. Se non trattati, gran parte dei malati di leishmaniosi presentano una progressiva emaciazione fino alla morte. L'infezione è endemica nella maggior parte dei paesi tropicali e subtropicali, con un centro di distribuzione corrispondente alla prevalenza di specifici vettori. Il trattamento classico consiste in composti pentavalenti antimonio o amfotericina B ma questi risultano spesso inefficaci e associati ad effetti tossici.

Il trattamento con IFN γ in combinazione con antimonio ha dimostrato fornire una cura in alcuni dei casi antimonio-resistenti (Sundar *et al.*, 1997).

Il trattamento con IFN γ via aerosol può essere parte di strategie alternative per evitare la resistenza farmacologica del batterio della tubercolosi che rischia di diventare una crescente preoccupazione negli anni a venire. (Condos *et al.*, 1997).

La prevenzione delle infezioni in pazienti in trattamento con regimi citostatici rappresenta un altro potenziale campo di applicazione. Una terapia aggressiva per alcune forme di leucemia, mentre ha successo nei bambini, negli adulti non riesce a evitare la comparsa di infezioni conseguenti a neutropenia con *Pseudomonas*, *Staphylococci* e funghi.

L'effetto dell'IFN γ in tali oggetti sarebbe quello di proteggere i pazienti con neutropenia agendo principalmente sul sistema dei fagociti mononucleati.

Un ulteriore campo di applicazione proposto di IFN γ è il controllo delle infezioni che si verificano in pazienti con grave trauma o sottoposti ad intervento chirurgico. Il supporto per questa possibilità viene da risultati sperimentali ottenuti con infezioni della ferita o *Klebsiella* e *Pseudomonas* (Hershman *et al.*, 1988a, 1988b, 1988c). IFN γ potrebbe agire in sinergia con antibiotici e potrebbe quindi non solo aumentare il tasso di sopravvivenza, ma anche i tassi di recupero (Mock *et al.*, 1996, Wasserman *et al.*, 1998).

PARTE SPERIMENTALE

3. METODICHE

3.1 Estrazione dell' acido ribonucleico (RNA)

L'RNA totale è stato estratto dai linfociti e tessuti in corso delle varie sperimentazioni mediante 2 metodiche: Tri Reagent (Sigma®, Germania) e kit commerciale QIAamp RNeasy Mini Kit (Qiagen).

3.1.1 Estrazione dell' RNA mediante TRI REAGENT

Questo sistema d'estrazione si basa su una soluzione pronta all'uso, contenente guanidina isotiocianato e fenolo (pH 5-6).

Tale solvente permette la formazione di complessi tra l'RNA, il guanidinio e le molecole d'acqua, ed esclude il DNA e le proteine, ostacolando la formazione di interazioni idrofiliche del DNA e delle proteine per sottrazione del substrato acquoso.

Si è partiti dopo centrifugazione del singolo campione costituito dal pellettato cellulare o dal tessuto omogenizzato con polvere di quarzo sterile che è stato risospeso in 1 ml di Tri-Reagent. I campioni vengono centrifugati a 12000xg per 10 minuti a 4°C, per rimuovere il materiale insolubile. Viene prelevato il surnatante contenente RNA e proteine e lasciato incubare a temperatura ambiente per 5', per permettere la completa dissociazione delle nucleoproteine complesse.

Sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio a cui è seguita un'altra incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti e una centrifugazione a 12000xg per 15' a 4°C. In seguito a questa centrifugazione sono state ottenute tre fasi:

- Rossa organica in basso contenente le proteine.
- Interfase contenente il DNA al centro.
- Fase acquosa incolore contenente l'RNA superiore.

La rimozione del DNA e delle proteine dalla fase acquosa è dovuta al cloroformio e al pH acido. E' stata quindi raccolta la fase acquosa e sono stati aggiunti 0,5 ml di isopropanolo.

Si centrifuga a 12000xg per 10 minuti a 4°C per far precipitare l'RNA e, rimosso il surnatante, il pellet viene lavato con 1 ml di etanolo al 75% procedendo infine a centrifugazione a 7500xg per 5 minuti a 4°C.

Il pellet è stato asciugato all'aria e poi risospeso in 30 µl di RNA secure (Ambion, USA) diluito in Rnase-free water.

Questa soluzione serve per impedire la degradazione dell'RNA e necessita per l'attivazione di un'incubazione per 20 minuti a 60°C dopo lo scongelamento.

L'RNA è stato poi conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

3.1.2 Estrazione dell'RNA mediante QIAamp RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Per i campioni di tessuto è stata eseguita l'estrazione dell'RNA anche con il kit QIAamp RNeasy Mini Kit (Qiagen) specifico per i tessuti e per i campioni biologici con componente cellulare. La tecnica di estrazione si basa sull'utilizzo di una colonnina munita di un filtro di silice che trattiene l'RNA. L'RNA legato al filtro è sottoposto ad una serie di lavaggi che rimuovono altre sostanze contenute nel campione. L'RNA viene infine eluito in una soluzione RNase-free; l'estratto è stato conservato a -80°C fino al momento dell'uso.

3.2 Trattamento con DNAsi

La retrotrascrizione è avvenuta dopo trattamento con DNAsi in modo da evitare l'amplificazione di materiale genomico di tipo desossiribonucleico che potesse andare a forviare i risultati ottenuti a livello di espressione genica quali- e quantitativa.

Nel caso infatti rimanga del materiale di natura desossiribonucleica l'attacco dei primer in fase di amplificazione del gene target porterà a due diverse tipologie di amplificato: il primo contenente anche gli introni (Figura 3.1a e 3.1b) caratterizzato da una lunghezza del frammento maggiore e un secondo frammento più corto frutto della retrotrascrizione a cDNA dell'RNA messaggero codificante per il gene di interesse nel quale sono contenuti esclusivamente gli esoni.

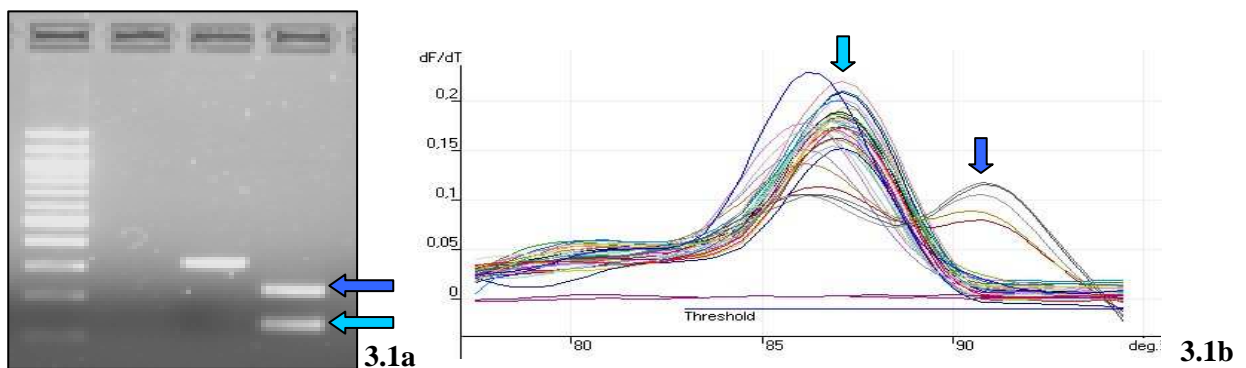


Figura 3.1 a: gel di agarosio colorato con etidio bromuro

Figura 3.1 b: temperature di melting di frammenti amplificati tramite Real Time PCR

In entrambi i casi si osserva la presenza di introni all'interno del frammento amplificato (freccia blu) a differenza delle dimensioni minori del frammento del gene target di interesse (freccia azzurra). Nel caso del gel di agarosio (fig 3.1a) ciò viene denunciato da una banda ad altezza superiore a quella attesa mentre con la Real Time (fig 3.1b) si assiste ad un aumento della temperatura di melting del frammento amplificato poiché tale parametro è proporzionale alla lunghezza del frammento stesso.

Per ovviare a tale problematica si è ricorso al disegno di primer a cavallo fra due differenti esoni o in alternativa al trattamento con enzima DNAsi. In questo secondo caso quantità stabilite di RNA estratto sono state sottoposte ad incubazione con 1 U dell'enzima DNAsi (Amersham Bioscience, UK) per 30 minuti a 37 °C e successivamente, per inattivare l'enzima stesso, a 95 °C per 5 minuti.

3.3 Retrotrascrizione a cDNA (RT)

Per poter applicare la reazione di PCR allo studio dell'RNA, è necessario che questo venga retrotrascritto in un filamento di DNA complementare (cDNA) fornendo così un appropriato substrato per le polimerasi; questo procedimento si chiama *Trascrizione Inversa* (Reverse Transcription).

Gli enzimi che si utilizzano per questo tipo di reazione sono le trascrittasi inverse dei retrovirus e sono sostanzialmente delle DNA-polimerasi-RNA-dipendenti.

Queste polimerasi possiedono, oltre all'attività polimerasica, un'attività RNasica e sono quindi in grado sia di produrre un filamento di DNA a partire da uno di RNA, che di degradare il filamento di RNA stampo una volta percorso, al fine di evitare la formazione di dimeri RNA-DNA che potrebbero ridurre l'efficienza della reazione della PCR seguente.

Per realizzare la retrotrascrizione sono stati utilizzati 2 metodi:

- gli esameri (*Random Hexamers*) che si allineano con siti multipli disposti lungo tutto il filamento di RNA generando dei cDNA di lunghezza variabile. Questo metodo è spesso usato per retrotrascrivere anche le estremità 5' o delle sequenze poco note e generare cDNA anche a partire da un RNA con strutture secondarie particolari.
- gli *Oligo d(T)* che riconoscono la coda di poli A secondo le regole della complementarità che caratterizza l'RNA messaggero codificante per i nostri gene target..

Nel nostro caso per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato l'enzima Reverse Transcriptasi derivante dal *Virus della Mieloblastosi Aviare* (AMV) (Takara, Japan).

Prima della retrotrascrizione, l'RNA è stato sottoposto a 60°C per 20 minuti necessari per l'attivazione dell'RNA secure.

E' stata preparata una miscela aggiungendo 5 µl di RNA trattato con DNasi in un volume totale di reazione di 20 µl contenente i reagenti elencati in **tabella 3.1**. La reazione di retrotrascrizione è stata incubata a 30°C per 10 minuti, a 45°C per 15 minuti e 2 minuti a 99°C.

Reagenti	Volume	Concentrazione Finale
MgCl ₂	4 µl	10 mM
10x RNA PCR Buffer	2 µl	2X
Rnase Free distilled H ₂ O	4.5 µl	0
dNTP Mixture	2 µl	2.5 mM
Rnase Inhibitor	0,5 µl	2 U/ µl
Reverse Transcriptase	1 µl	0,5 U/ µl
Random Hexamers	0.4 µl	20 pmol
Oligo d(T)	0.6 µl	1.5 pmol
Total mix volume	15 µl	

Tabella. 3.1 Protocollo di retrotrascrizione RNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1 (Takara, Japan)

3.4 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

La tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ideata da Mullis nel 1985, è una reazione enzimatica *in vitro* che consiste nella sintesi ciclica di DNA, le cui molecole vengono moltiplicate fino a raggiungere un numero molto elevato di copie.

Questa polimerizzazione è sequenza-specifica, in quanto solo i tratti di DNA caratterizzati dalla sequenza di interesse alle estremità sono oggetto di sintesi e amplificazione grazie ad un meccanismo di riconoscimento delle estremità della sequenza bersaglio tramite l'appaiamento di queste regioni con oligonucleotidi complementari specifici che guidano la reazione.

Ogni ciclo della reazione di PCR comincia dalla dissociazione, per riscaldamento, delle due eliche del DNA bersaglio (*denaturazione*). Nella seconda fase interviene la coppia di **oligonucleotidi specifici**, lunghi ciascuno circa una ventina di basi. Ciascuno di essi può appaiarsi specificamente con una delle due eliche del DNA bersaglio (*annealing*) e, in virtù delle sue dimensioni ridotte, l'associazione dell'oligonucleotide compete vantaggiosamente con la riassociazione delle due eliche tra loro. In questo modo gli estremi 5' degli oligonucleotidi segnano su ciascuna elica gli estremi del frammento che viene amplificato, mentre i loro estremi 3' offrono alla **DNA polimerasi** il gruppo idrossilico di innesco della reazione, che progredisce contemporaneamente su entrambe le eliche, nelle due direzioni antiparallele con l'estensione (*estensione*) dei due oligonucleotidi tramite i nucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione.

Alla fine del primo ciclo, quindi, il frammento bersaglio compreso fra le sequenze dei due oligonucleotidi è stato duplicato, e il secondo ciclo sottopone, ora, due copie del frammento al procedimento di *denaturazione*, *annealing* ed *estensione*; al termine di quest'ultimo, le coppie del frammento sono diventate quattro, e così via, per 20-50 cicli di amplificazione successivi. Poiché ogni ciclo della reazione dura solo pochi minuti, nel giro di qualche ora si possono produrre elevatissime quantità di DNA bersaglio. Si calcola, infatti, che dopo 20 cicli di reazione, per ogni molecola bersaglio originariamente presente, siano state prodotte 10^{12} copie, tutte uguali alla molecola di partenza.

POLYMERASE CHAIN REACTION

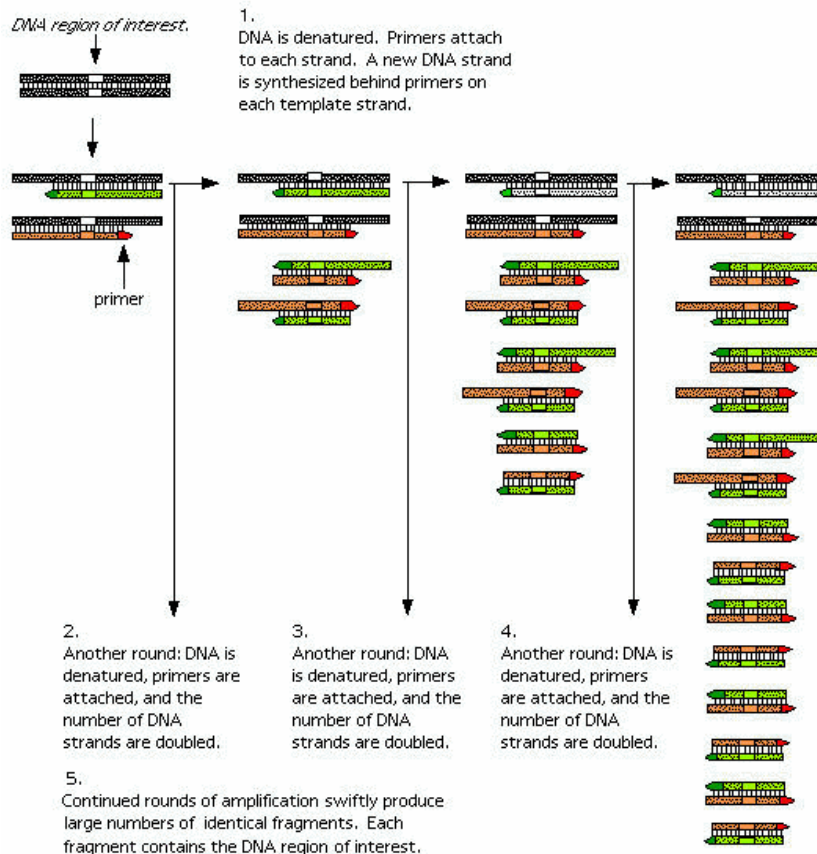


Figura. 3.2 Schema della tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

La miscela di reazione contiene i *primers* specifici, i nucleotidi trifosfati, un tampone di reazione adatto all'enzima, il DNA bersaglio e l'enzima DNA polimerasi termostabile. La reazione di PCR si basa sull'utilizzo di DNA polimerasi isolate da microrganismi termofili, in grado di vivere a temperature molto elevate. Gli enzimi ottenuti da questi microrganismi risultano, infatti, stabili alle temperature alle quali viene sottoposto il DNA per poter essere denaturato (circa 95°C).

3.4.1 Specificità dell'amplificazione e selezione dei primers

La specificità dell'amplificazione dipende da quanto la sequenza target si differenzia da quella dei primers selezionati per l'appaiamento specifico (**Tab 3.2**).

Per campioni complessi di DNA, come il DNA genomico totale di una cellula di mammifero o il genoma totale di un virus a DNA, spesso è sufficiente progettare due *primer* lunghi 20 nucleotidi ciascuno. Questo perché, in condizioni normali, la probabilità che si verifichi accidentalmente un appaiamento perfetto in un qualche punto del genoma per ciascuno dei *primer* è estremamente bassa, e la probabilità che entrambe le sequenze si trovino per caso a stretto contatto nella direzione specificata è veramente remota. Anche se solitamente vengono scelte condizioni tali da assicurare che siano stabili soltanto le doppie eliche costituite da *primer*

e sequenza bersaglio perfettamente appaiate, è comunque possibile osservare prodotti spuri di amplificazione (prodotti aspecifici). Questo può succedere se una o entrambe le sequenze scelte come *primer* contengono parte di una sequenza di DNA ripetitivo, anche se solitamente i *primer* sono scelti in modo da evitare l'appaiamento con questo tipo di sequenze.

Lunghezza	Solitamente si utilizzano primer di 18-24 nucleotidi di lunghezza. La lunghezza del primer garantisce la specificità e riduce la possibilità di legame in siti non specifici. Tuttavia, primer più lunghi di 24 basi non garantiscono una maggiore specificità in quanto possono portare ad appaiamenti interni aspecifici.
Composizione in basi	Sostanzialmente vanno evitate le unità ripetute in tandem di uno o più nucleotidi. La % complessiva in GC deve essere intorno al 40-60% o rispecchiare il contenuto di GC del DNA bersaglio. Si consiglia di disegnare dei primers nei quali la maggiore quantità di G e C sia nella regione centrale o all'estremità 5', al fine di incrementarne la stabilità e di conferire una maggiore stabilità al complesso primer-sequenza target.
Struttura secondaria	Vanno evitate sequenze la cui struttura secondaria tenda a formare ripiegamenti a forcina.
Estremità 3'	Va evitata la complementarità tra le due basi all'estremità 3' dei due primer, altrimenti essi possono formare dei dimeri, che riducono l'efficienza dell'amplificazione. Inoltre, è preferibile disegnare primer con almeno tre A o T nelle ultime 5 basi al 3', evitando regioni ricche di GC in questa estremità. Infine, è importante evitare nucleotidi aspecifici proprio in tale regione, in quanto è necessario che gli ultimi nucleotidi al 3' si appaiano perfettamente alla sequenza bersaglio per dare inizio alla reazione di estensione ad opera della polimerasi.

Tabella 3.2 Regole per il disegno dei *primer* per la PCR.

Un altro importante parametro che caratterizza i primers è la *temperatura di melting* (T_m). Essa rappresenta la temperatura alla quale il 50% del primer e della sequenza bersaglio sono presenti sotto forma di una molecola a doppio filamento. La T_m è necessaria per stabilire la temperatura di annealing della PCR. Teoricamente, una temperatura di annealing deve essere abbastanza bassa da garantire l'ibridizzazione del primer alla sequenza target, ma sufficientemente alta da limitare gli appaiamenti aspecifici. La temperatura di annealing viene solitamente stabilita intorno a 3°C al di sotto della T_m dei primer o di quella del primer a T_m inferiore nel caso in cui i due primer utilizzati abbiano due T_m diverse.

Per calcolare la T_m di un primer si possono utilizzare diverse formule, ma le due più comunemente utilizzate sono:

$$1) T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})$$

$$2) T_m = 81,5 + 16,6 \times (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 \times (\% \text{G}+\text{C}) - 675/n$$

Dove n = numero di basi e

$[\text{Na}^+]$ = cationi monovalenti come Na^+ o K^+ .

La prima di queste formule è valida per *primer* con meno di 18 basi, mentre la seconda si basa sul contenuto di GC del primer e sulla concentrazione di sali nella reazione e può essere applicata anche a *primer* più lunghi.

Nel corso delle nostre sperimentazioni le coppie di primers per ogni citochina sono state in parte tratte dalla letteratura e in parte disegnate mediante il software *Oligo* (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA), (**tabelle 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6**) tali da evitare *hairpin*, formazione di *primer dimers* e al contempo, ottenere frammenti di lunghezza opportuna da poter essere amplificati mediante Real Time (Bustin, 2000).

Per ottimizzare la resa dell'amplificazione si è ricorsi anche all'utilizzo di reazioni di amplificazione a gradiente in modo da identificare la temperatura ottimale per l'appaiamento dei due primer di interesse (**Figura 3.3**).

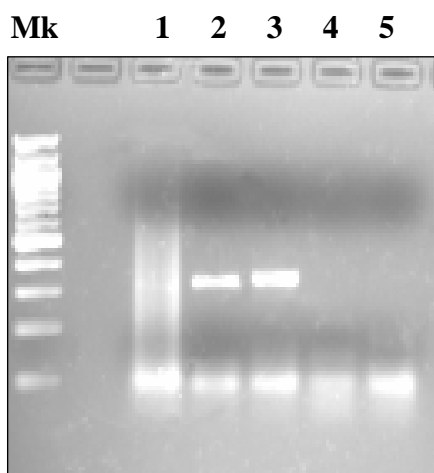


Fig 3.3. Gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. Per ottimizzare la resa dell'amplificazione si è ricorsi anche all'utilizzo di reazioni di amplificazione a gradiente in modo da identificare la temperatura ottimale per l'appaiamento dei due primer di interesse. In tale gel si evidenzia l'amplificato per il gene CALCA di cane ottenuto a diverse temperature di annealing da milza. **Lane 1:** 56,9°C; **lane 2:** 58,1°C; **lane 3:** 59,4°C; **lane 4:** °C **lane 5:** 60,2°C.

Primers disegnati mediante software OLIGO per le diverse specie animali

Gene target	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
GADPH	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	CCCTCCACGATGCCAAGT	119
IL 2	TATCTGTTTCGGTCGTTTCAT	GTTAACCTTGGGCGCGTAA	236
IL 8	AGCTGGCTGTTGCTCTCTTGG	ACCTGCACAACCTTCTGCAC	262
IFN γ	AGCCCAGATGTAGCTAAGGG	CTCCAGTTTCTCAGAGCTGC	216
IL 6	AGGCGATTTGCTTGATCAG	TCTTTGCGTTCCTTACCCA	188
TNF α	AAGCATGATCCGGGATGT	TGGGCTACCGGCTTGTTAC	316
IL 1 β	AACAGCCATGGCAACCGTA	GGCCACGATGACCGACA	232
IL 10	TGCACAGCTTACTGTTGACC	CGCAGGGTCTTCAGCTTCTC	178

Tab. 3.3: Primers disegnati per la specie bovina (*Bos Taurus*)

Gene target	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
β actina	CTGGCACCACACCTTCTACAACGAG	TCACCGGAGTCCATCACGA	214
IL 2	GCTTGCATCGCACTAACTC	CCTTCTTGGGCATGTTAAT	187
IL 8	TCTCTTGGCCGTCTTCCTG	CCGTTGACGAGCTTTACAA	195
IFN γ	GTGTGCGATTTTGGGTTCTTCTA	TTGAATGACCTGGTTATCT	235
IL 6	CTGCCCTGAAAAATGAGATGTGTA	ACTCGTTCTGGAGGTACTC	204
TNF α	AGCTCTCCTGGGCACCTAC	TGGGGTTTCGAGGGGTGTTAC	205
IL 1 β	GAGGCAGCCATGGCAGCAGTA	TGTGAGCAGGGAACGGGTATCTT	257
IL 4	CCTTTGCTGGCCCCGAAGAA	GTACAGCAGGTCCCGTTTG	157

Tab. 3.4 Primers disegnati per la specie equina (*Equus caballus*)

Primers disegnati mediante software OLIGO per le diverse specie animali

Gene target	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
GADPH	AACATCATCCCTGCATCCA	CAGATCCACGACGGACACA	123
IL 2	CTCGCATCCTGTGTCACAT	GGAGCTCCTGTAGGTCCAT	160
IFN γ	TTTAACTCAAGTGGCATAG	CAAACCTGGCAATACTCA	250
IL 6	TGAGATCTACTCGGCAAAC	TTGTTCTCTACGAAGAACT	125
TNF α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	GGGTTGTACCTTGTCTACTCCCA	175
IL 1 β	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTTCCAGCTGCA	152
MCP 1	TGTCACCAAGCTCAAGAGA	CAGATTTACGGGTCAACTT	173

Tab. 3.5 Primers disegnati per la specie murina (*Mus musculus*)

Gene target	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
GADPH	GCGTGAACCACGAGAAGTATAA	CCCTCCACGATGCCAAGT	119
TGF β	GAGAAGAAGCTGCTGCGTCC	TTGCTGTACTGCGTGTCCA	146
CALCA	AGTCCTCCCCCTTCCTGGCTTTCA	CCGCTGGCTATGTCCCTTTTCTTG	361
IL 8	ACTTCCAAGCTGGCTGTTGC	GGCCACTGTCAATCACTCT	172
IFN γ	TTTCAGCTTTGCGTGATTT	ATTTGGCTCTGAATGATTG	188
IL 6	TGCCACTTCAAATAGTCTA	AGTTTGGGAAGATGTAGGT	168
TNF α	TGCCGTCAGATGGGTTGTA	TTGATGGCAGAGAGTAGGT	145
IL 1 β	AGAAGCTGAAGAAGCCCTG	CCTGTAAGTTGCAGTCCAC	154

Tab. 3.6: Primers disegnati per la specie canina (*Canis familiaris*)

Per testare l'efficacia dei primers è stato raccolto il sangue in EDTA da bovini adulti clinicamente sani. Linfociti in particolare (95%) e limitate cellule periferiche mononucleate (PBMCs) sono state separate mediante gradiente di densità di centrifugazione usando il composto privo di tossine Ficoll-Paque (gravità specifica 1.077, Pharmacia Biotech, Quebec, Canada) e lavate con soluzione fosfato salina (PBS).

Tale metodica impedisce che durante le manualità di prelevamento del buffy coat permangano dei residui di globuli rossi che contenendo emoglobina vadano ad inficiare la funzionalità dell'enzima di amplificazione Taq polimerasi.

Queste sono state incubate fino a raggiungere la concentrazione di 5×10^6 cellule per ml e messe in piastra in RPMI 1640 medium (Gibco BRL Burlington, Ont., Canada) contenente il 10 % di siero fetale bovino (Gibco BRL) supplementato con streptomicina, penicillina G e furazolidone ad una concentrazione di 100mg/ml rispettivamente. Per catalizzare le reazioni mitotiche fra le PBMCs è stata addizionata della Concanavalina A (ConA) alla sospensione cellulare ad una concentrazione di 10 mg/ml. Quindi un volume di 2 ml di sospensione cellulare è stata posta ad incubare per 24 e 48 ore a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂.

In ciascuna mix di reazione sono contenuti diversi reagenti a seconda del kit commerciale considerato (**tabelle 3.7 e 3.9**) e dopo aggiunta di cDNA, sottoposti a cicli di amplificazione come elencato nelle **tabelle 3.8 e 3.10** con temperature di annealing per l'appaiamento dei primer diverse a seconda del gene target considerato.

Componenti	Volume/reazione	Concentrazione Finale
10x QIAGEN PCR Buffer	5 µl	1x
5x Q-solution	10 µl	1x
dNTP mix (10mM each)	4 µl	250 µM of each dNTP
Primer A	1	0,4 µM
Primer B	1	0,4 µM
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	2,5 units/reaction
Acqua distillata	23,75	
Templato DNA	5 DNA	≤ 1 µg/reaction
Volume Totale	50 µl	

Tabella 3.7 Componenti reazione di amplificazione con kit Qiagen

	Temperatura (°C)	Tempo per ciclo	N° cicli
In attivazione dell'Rtasi e denaturazione iniziale	94°C	2 min	1 ciclo
Denaturazione	94°C	20 sec	40 cicli
Appaiamento dei primers	temperatura diversa a seconda della coppia di primer considerata	30 sec	
Estensione del filamento di DNA	72°C	20 sec	
Estensione finale	72°C	7 min	1 ciclo

Tab. 3.8: Protocollo utilizzato per la reazione di amplificazione con kit Qiagen

Per amplificare il gene CALCA di cane si è ricorsi al kit Titanium Taq PCR kit (Clontech). Sono stati aggiunti 2,5 µl di cDNA alla miscela contenente i reagenti elencati nella tabella 3.9 per un volume totale di 25 µl.

Componenti	Volume/reazione	Concentrazione finale
Buffer	2,5 µl	10x
dNTP	0,5 µl	10mM
Primer forward	0,5 µl	10µM
Primer reverse	0,5 µl	10µM
Taq	0,5 µl	50x
Distilled water	18 µl	
Template DNA	2,5 µl	
Total volume	25 µl	

Tabella 3.9. Componenti reazione di amplificazione con Taq Titanium.

	TEMPERATURA	TEMPO PER CICLO	N° CICLI
Inattivazione RTasi e denaturazione iniziale	94 °C	5 min	1
Denaturazione	94°C	30 sec	40
Appaiamento dei primers	XX°C	30 sec	
Estensione del filamento di DNA	68°C	1 min	
Estensione finale	68°C	7 min	1

Tabella 3.10. Protocollo utilizzato per la reazione di amplificazione con Taq Titanium.

3.4.2 Elettroforesi su gel di agarosio

Il risultato dell'amplificazione è stato visualizzato con corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con Bromuro di Etidio (**Figure 3.4a, 3.4b**). Al campione (5 μ l) è stato aggiunto 1 μ l di blu di bromofenolo per evidenziare l'andamento della corsa. La specificità del prodotto è stata valutata con l'uso di un marker di riferimento 100 bp (New England, UK).

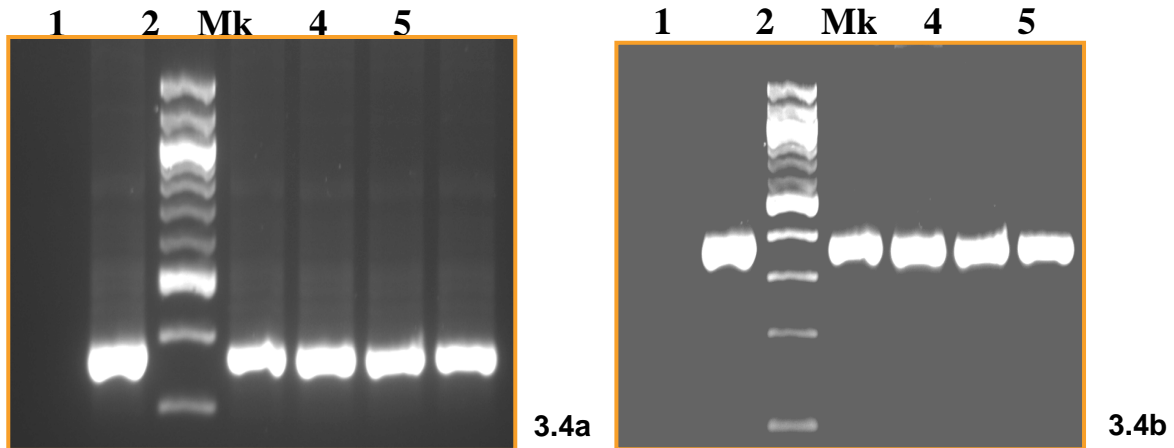


Figura 3.4a e 3.4b: Gel agarosio al 2% colorato con etidio bromuro . In tali gel si mette in evidenza l'amplificato caratterizzato da un'altezza tipica rispetto ad un marker preso come riferimento.

fig 3.4a: amplificati del gene per **IL 8** di cavallo **lane 1:** controllo negativo, **lane 2:** controllo positivo, **Mk:** marker **lane 4,5,6,7** amplificati di cDNA derivanti da lavaggio bronco-alveolare (BAL) di soggetti affetti da *Recurrent Airways Obstruction* (RAO)

fig 3.4b; **lane 1:** controllo negativo, **lane 2:** controllo positivo, **Mk:** marker **lane 4,5,6,7** amplificati di cDNA codificanti per **CALCA** di cane derivanti da tiroide di soggetti parvovirofici.

3.5 Sequenziamento degli amplificati

I prodotti dell'amplificazione sono stati purificati con High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germany) e sequenziati (Figura 3.5) in entrambe le direzioni con il sequenziatore automatico CEQ 2000 XL Analysis System (Beckman Coulter Inc., USA). Le sequenze ottenute sono state allineate e comparate usando il programma Clustal W del software Lasargene Biocomputing (DNA-STAR Inc. Madison, USA) con sequenze disponibili su GenBank. L'analisi filogenetica è stata condotta con il programma BLAST.

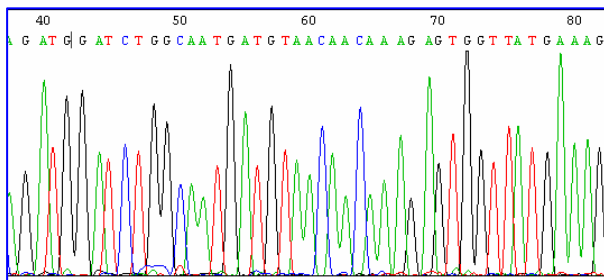
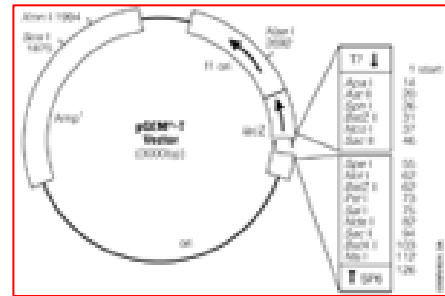


Figura 3.5 Sequenziamento di frammento specifico evidenziato durante l'amplificazione del TNF α canino.

3.6 Purificazione e clonazione di frammenti

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro utilizzando un marker 100 bp di DNA standard (N3231S, Biolabs, New England, UK) per determinare le dimensioni delle bande. La purificazione dei prodotti derivanti dall'amplificazione è avvenuta con il kit commerciale High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) per ogni citochina sono stati clonati in un plasmide e trasformati in E. Coli TOP 10 (**Figura. 3.6**) (Topo TA Cloning, Invitrogen).

Figura 3.6 E. Coli in cui sono stati inseriti i frammenti codificanti per i geni target delle varie citochine.



I plasmidi ricombinanti contenenti il vettore competente per conferire resistenza all'ampicillina sono stati seminati su piastra contenente tale antibiotico in modo da selezionare le colonie nelle quali si era inserito il frammento codificante per il gene target. Dopo controllo dell'avvenuta clonazione nel batterio con ulteriore reazione di polimerizzazione a catena (**figure 3.7, 3.8, 3.10**), i plasmidi sono stati linearizzati mediante taglio a carico di una sequenza target usando l'enzima di restrizione endonucleasi *PmeI* (Fermentas) per evitare la presenza di superavvolgimenti e per stimolare più efficacemente l'amplificazione del materiale genomico. Di tali plasmidi ricombinanti sono state effettuate delle diluizioni in base 10 da 10^9 copie a 10^1 copie per tracciare la curva standard di riferimento (**fig 3.14a, 3.14b**); di queste almeno 6 diluizioni sono state incluse in ogni Real Time PCR e da tali punti si sono interpolate le concentrazioni della singola citochina in base alla fluorescenza emessa dai campioni (Bustin, 2000; Overbergh *et al*, 2003). Per risalire dal peso molecolare del plasmide tagliato al numero di coppie di questo si è ricorsi al calcolo mediante la seguente formula e quantificazione mediante marker quantitativo N3231S (**figura 3.9**) (Biolabs, New England, UK):

$$\text{numero coppie plasmidi} = \frac{6,022 * 10^{23} * \text{ng/microlitro} * 10^{-9}}{(\text{bp plasmide} + \text{gene target}) * 660}$$

Mk 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 Mk

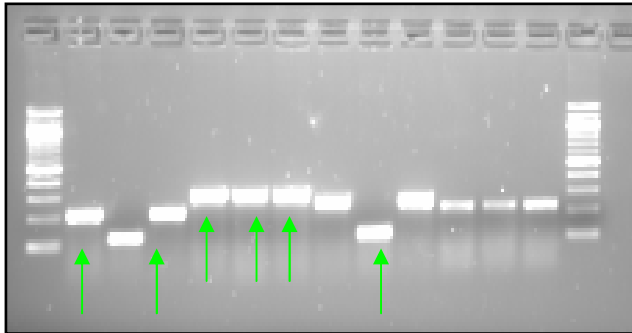


Figura 3.7. Gel agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. Verifica dell'avvenuta inserzione del gene target all'interno del plasmide, ma si notano inserzioni di amplificati codificanti per frammenti aspecifici (freccia verde).

Lane 1, 2, 3: GAPDH bovino;

Lane 4, 5, 6: IFN γ bovino;

Lane 7, 8, 9: IL 8 bovino;

Lane 10, 11, 12: IFN γ equino.

1 2 3 4 5 6 7 Mk

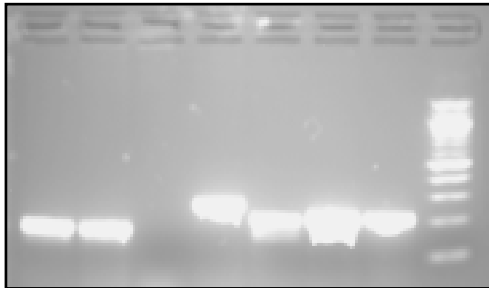


Figura 3.8. Gel agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. Conferma dell'avvenuta inserzione del vettore plasmidico codificante per il gene target di interesse ad esclusione della lane 3.

Lane 1 e 2: IL 10 bovino

Lane 3 e 4: TNF α bovino

Lane 5, 6, 7: IL 1 β bovino

Mk: marker

Mk 1 2 3 4 5 6 7 8 Mk

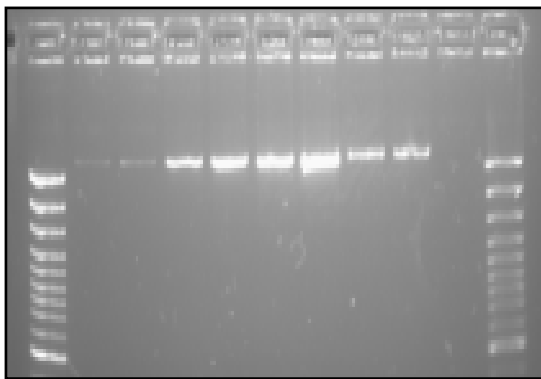


Figura 3.9: Gel agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. Quantificazione del plasmide dopo digestione enzimatica che ne ha permesso la linearizzazione. Per ogni plasmide sono stati caricati 2 e 3 microlitri della stessa mix.

Lane 1 e 2: GAPDH murino

Lane 3 e 4: IL 1 β murino

Lane 5, 6, 7: IL 6 murino

Lane 7 e 8: TNF α murino

Mk: marker

Mk 1 2 3 4 5 6 7 8

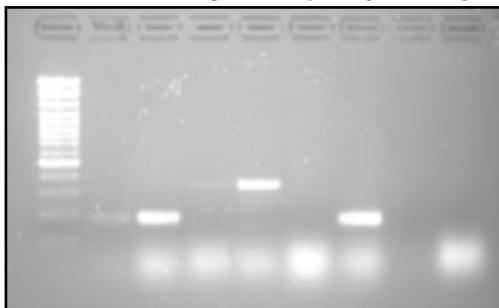


Figura 3.10. Gel agarosio al 2% colorato con etidio bromuro in cui è stata valutata la temperatura ottimale di annealing a cui settare il protocollo di amplificazione.

Lane 1 e 2: MCP 1 murino (53°C e 54°C rispettivamente)

Lane 3 e 4: IFN γ murino (55,1°C e 54,2°C rispettivamente)

Lane 5 e 6: IL 2 murino (58°C e 59°C rispettivamente)

Lane 8: controllo negativo

Mk: marker

3.7 Real Time PCR

La *Real-Time PCR* è una metodica che permette di visualizzare l'andamento della reazione di amplificazione già dalle sue prime fasi, ottenendo una stima quantitativa del prodotto di PCR che si sta formando in contemporanea allo svolgersi della reazione, cioè in tempo reale (“*real time*”). La misurazione della cinetica della reazione nelle fasi precoci della PCR costituisce un vantaggio rispetto alla PCR tradizionale, che invece necessita della rivelazione dell'avvenuta amplificazione solo quando la reazione ha raggiunto il punto-finale. Questo tipo di rilevazione, però, oltre ad apportare una notevole spesa di tempo e ad essere, alle volte, poco chiarificativa, è limitativa in quanto, nelle ultime fasi della reazione si verificano delle differenze nel livello di amplificazione tra i diversi campioni, dovute al consumo dei reagenti che avviene con un tasso diverso per ciascun amplificato.

Una reazione di PCR, infatti, può essere divisa schematicamente in tre fasi:

1. *Fase esponenziale*: l'amplificato duplica ad ogni ciclo (con il 100% di efficienza della reazione). In questa fase la reazione è molto specifica e precisa.
2. *Fase lineare*: è quella che presenta la maggiore variabilità tra campione e campione, in cui i componenti della reazione iniziano a consumarsi. La reazione inizia a diventare più lenta e i prodotti possono iniziare a degradarsi.
3. *Fase di plateau*: la reazione si blocca e non vengono prodotti più amplificati, che continuano invece ad essere degradati.

In ciascuna mix di reazione, la fase di plateau può sopraggiungere in momenti diversi, a seconda delle differenti cinetiche di reazione che si sono verificate all'interno di ogni reazione. Queste differenze possono essere visualizzate proprio in questa fase, che è quella che viene misurata nella PCR tradizionale e che è conosciuta come rivelazione al punto finale. Solitamente, le tradizionali tecniche di rivelazione sono costituite da una corsa elettroforetica in gel di agarosio con bromuro di etidio e successiva visualizzazione con raggi ultra-violetti. Questo metodo di visualizzazione risulta però poco preciso, poco sensibile, non quantitativo e non automatizzabile. Alla luce di queste considerazioni, la possibilità di poter visualizzare il prodotto di amplificazione direttamente durante la reazione, evitando la corsa elettroforetica, rappresenta un grosso passo avanti.

Il monitoraggio del prodotto di amplificazione che si va man mano accumulando nella reazione, è reso possibile nella real-time dalla marcatura di primers, di sonde o del prodotto di amplificazione, tramite molecole fluorogeniche.

Tra i metodi più comuni, vi è il metodo *SYBR Green* (**fig. 3.11**) che sfrutta la capacità di questa molecola di legare il solco minore del doppio filamento di DNA prodotto durante la reazione di amplificazione. Quando questo avviene, l'intensità della fluorescenza emessa dal *SYBR Green* aumenta in maniera sostanziale rispetto a quando esso si trova libero nel mezzo, costituito dalla miscela di reazione. Il segnale generato dal *SYBR Green* cresce proporzionalmente alla quantità amplificato prodotto.

Questo metodo risulta meno specifico di altri quali il *saggio dell'esonucleasi al 5'*, perché il *SYBR Green* è in grado di legare qualsiasi molecola di DNA a doppio filamento.

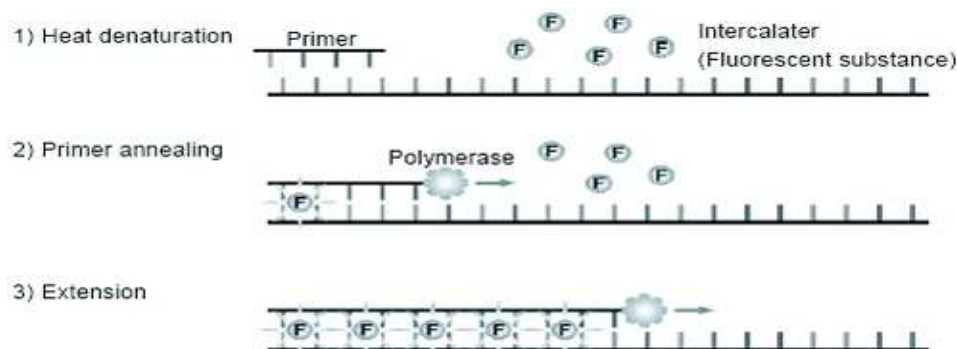


Fig.3.11: Schematizzazione della metodica di emissione di fluorescenza in corso di amplificazione con SYBR Green

I vantaggi costituiti da tale metodica però sono una maggiore velocità per la messa a punto e un minor costo di esecuzione.

Tutte le reazioni di Real Time PCR sono state messe a punto con il rotore Rotor-Gene 3000 System (Corbett Research, Australia). Le amplificazioni sono avvenute in un volume totale di 25 µl contenente i reagenti come descritto di seguito; 1X di SYBR PREMIX Ex Taq Takara, 200 nM per ogni primer forward e reverse, 1X di Rox References Dye e 2 µl di cDNA come raccomandato dal protocollo del produttore.

I parametri di ogni ciclo sono stati i seguenti: 10 min a 95°C per l'attivazione della polimerasi seguiti da 40 cicli di 15 sec a 95°C, 15 sec di annealing (differenti a seconda della coppia di primers considerati), 20 sec a 72°C.

Il segnale di emissione della fluorescenza è stato rilevato (**fig. 3.12b, 3.13**) sul canale FAM (multichannel machine) (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) con una fluorescenza rilevata a partire dal termine dello step a 72°C di ogni ciclo.

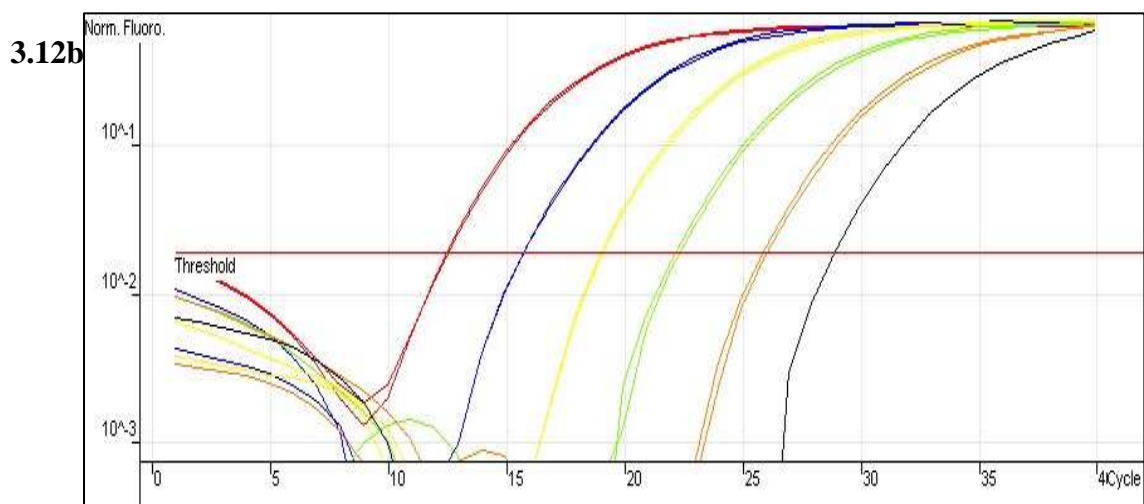
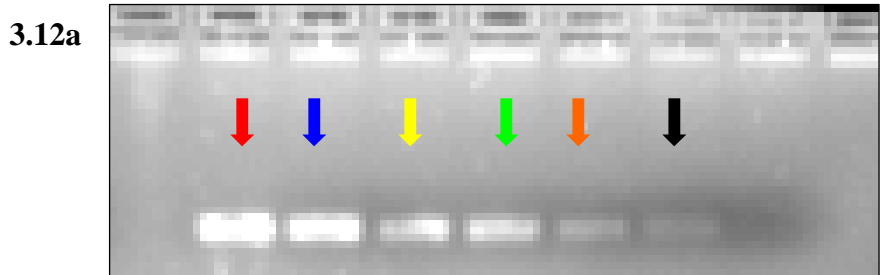


Figura 3. 12a e 3.12b. Rappresentazione dei prodotti di amplificazione su gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro (**fig. 12a**) ed emissione di fluorescenza durante Real Time PCR in singoli campioni costituiti da diluizioni plasmidiche (**fig 8.12b**). Nella **figura 8.12a** la maggior quantità di amplificato è denunciato da una maggior intensità della banda mentre nella **figura 8.12b** si nota un diverso punto di intersezione con il ciclo soglia (ciclo di threshold Ct) proporzionale alla fluorescenza emessa dal singolo campione in base all'aumentare dei cicli di amplificazione, a sua volta proporzionalmente al numero di doppi filamenti che si vengono a formare. Nota bene: a colori uguali corrisponde diluizione uguale.

E' stata tracciata una curva di melting dopo l'amplificazione mantenendo la temperatura a 72°C per 12 s seguiti da gradualmente aumenti di 0,1°C/s fino a raggiungere i 95°C, con l'acquisizione della fluorescenza in ogni step sul FAM channel (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5). Il test della temperatura di melting del prodotto di reazione può ovviare al problema della fluorescenza data dai prodotti di reazione aspecifici. Ogni prodotto infatti avrà una temperatura di melting diversa in base alla sua caratteristica sequenza. La visualizzazione della temperatura di melting dei prodotti di reazione correlata alla fluorescenza degli stessi evidenzia la presenza dei prodotti aspecifici permettendo la loro discriminazione (**fig. 3.13**).

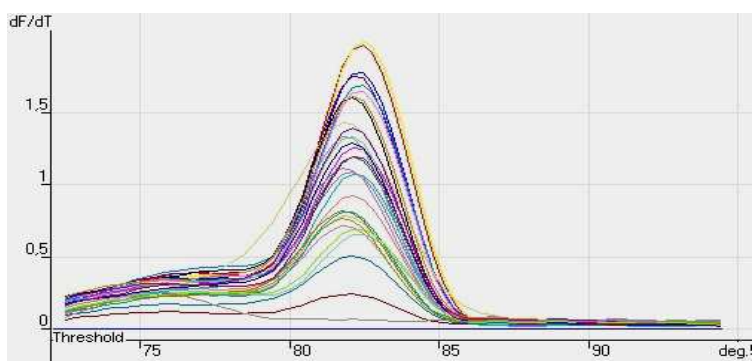


Fig. 3.13 Grafico che rileva le temperatura di melting dei frammenti amplificati in corso di polimerizzazione a catena. La presenza di un unico picco di temperatura indica la specificità dell'avvenuta reazione.

3.7.1 Espressione dei risultati di Real Time PCR

La quantificazione dell'espressione genica mediante Real Time PCR prevede una normalizzazione dei dati ottenuti poichè la quantità rilevata dalla fluorescenza del campione dipende da un notevole numero di fattori quali quantità del materiale di partenza, specificità ed efficienza della reazione di trascrizione, efficienza della reazione di amplificazione. Al fine di ridurre al minimo la variabilità intercampionaria e intracampionaria aumentando la ripetibilità della metodica a livello di letteratura (Schmittgen *et al.*, 2000; Overbergh *et al.*, 2003; Schmittgen *et al.*, 2000) si è deciso di prendere come riferimento dei geni ubiquitariamente espressi indipendentemente da matrice di partenza o patologia in atto definiti *housekeeping*. I più comuni geni *housekeeping* considerati sono gli RNA messaggeri codificanti per gliceraldeide 3 fosfato-deidrogenasi (GAPDH), la β actina, la $\beta 2$ microglobulina e l'unità ribosomiale 18S (Schmittgen *et al.*, 2000). La scelta su quale di questi considerare come normalizzatore della mia reazione di amplificazione andrebbe valutata in ogni singolo caso. La quantificazione genica può essere come già detto di tipo assoluto o relativo (Whelan *et al.*, 2003; Livak *et al.*, 2001).

Nella *quantificazione di tipo assoluto* il frammento di interesse viene inserito all'interno di una cellula competente mediante vettore dopo purificazione e, effettuate delle diluizioni in scala logaritmica di tale plasmide a concentrazioni note, in base alla fluorescenza emessa da queste si traccia una retta di riferimento sulla quale si estrapolano le concentrazioni dei campioni a concentrazione ignota (**Fig 3.14a e 3.14b**). In questa caso il risultato verrà espresso da un preciso numero di filamenti per microlitro di campione. Tale numero verrà diviso per il numero di copie dell'*housekeeping* in modo da rilevare eventuali over o under expression del mio gene.

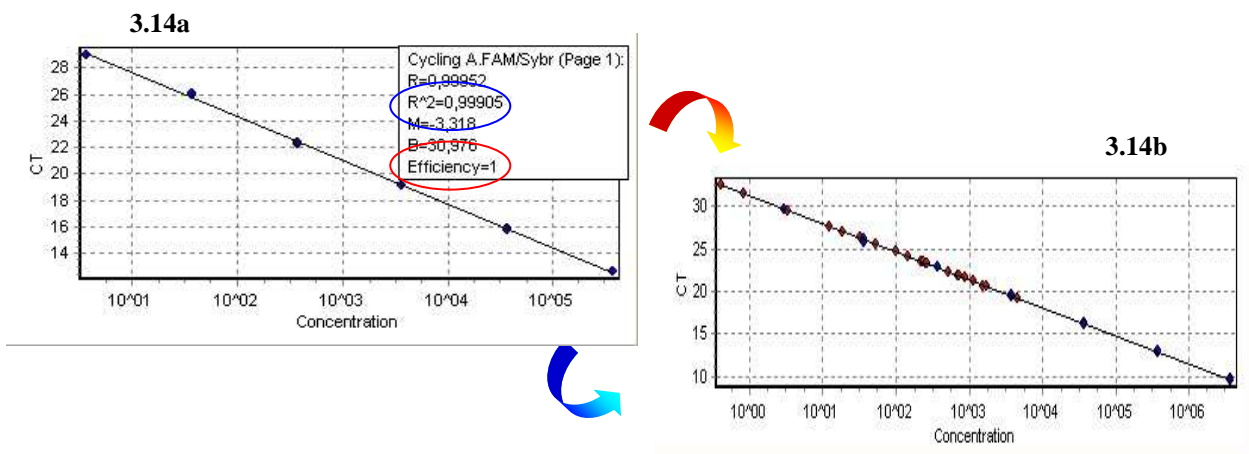


Figura 3.14a e 3.14b Le diluizioni plasmidiche contenenti il gene di interesse, emettendo caratteristiche fluorescenze, permettono di tracciare una curva di relazione fra fluorescenza e concentrazione di doppi filamenti (**figura 3.14a**) sulla base della quale vengono poi estrapolate le concentrazioni di doppi filamenti generatisi in seguito ad amplificazione dei campioni a concentrazione ignota (**figura 3.14b**)

In tale tipo di quantificazione i valori da tenere in considerazione per valutare il buon risultato dell'avvenuta amplificazione, oltre ad un'assenza di contaminazioni denunciata da mancata emissione di fluorescenza da parte del controllo negativo o diversa temperatura di melting del frammento amplificato, sono

- l'efficienza di amplificazione (**E** cerchiata in rosso)
- la deviazione quadratica media delle concentrazioni rivelate nei campioni noti rispetto a quelle attese (**R²** cerchiata in blu).

Entrambi i dati devono avvicinarsi il più possibile ad 1.

Nel caso invece della *quantificazione di tipo relativo*, l'unico dato sul quale si può ragionare è il ciclo soglia (**Ct** ciclo di threshold) del singolo campione non disponendo di adeguati standard costituiti dai plasmidi precedentemente quantificati come riferimenti.

Tale metodica, molto più rapida e meno costosa, prevede però un'elaborazione matematica dei dati ottenuti tale da poter correlare i cicli soglia delle due espressioni geniche.

Nella nostre sperimentazioni la concentrazione di ogni citochina è stata espressa come rapporto con la quantità di housekeeping mediante la formula suggerita da Livak e Schmittgen (2001) come rappresentato qui di seguito con **Ct** ad indicare il ciclo di threshold:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

dove $\Delta\Delta Ct$ è calcolato come:

$$\frac{(\text{Ct gene di interesse} - \text{Ct housekeeping}) \text{ campione di interesse}}{(\text{Ct gene di interesse} - \text{Ct housekeeping}) \text{ controllo (calibratore)}}$$

3.8 Prelievo e maturazione di cellule derivanti da midollo osseo

Dopo aver rimosso gli arti posteriori in maniera asettica, questi sono stati posti in capsula Petri contenente soluzione salina al 5% di siero fetale bovino. Sono stati quindi rimossa la cute e i muscoli con garze e strumenti sterili.

Le cellule derivanti dal midollo osseo (*Bone Marrow Dendritic Cells BMDC*) sono state prelevate dal femore con ago 25 gauge mediante delicata aspirazione. Dopo aver lisato i globuli rossi con cloruro d'ammonio, le BMDC sono state seminate in piastra da 6 pozzetti risospendendo le cellule ad una concentrazione di 1×10^6 cellule in terreno cDMEM addizionato al 5% di siero fetale bovino e 20 ng/ml di GM CSF ricombinante di natura murina e, dopo incubazione in termostato a CO₂ al 10%, al giorno 6° sono state raccolte le cellule non adese. La valutazione dello stadio maturativo di tali cellule è avvenuta mediante analisi con citometria di flusso mediante l'anticorpo monoclonale CD11c (BD Pharmingen, CA). La positività per tale cluster di differenziazione indica la capacità di tale di cellule di fagocitare l'antigene ed è caratteristica per cellule Natural Killer, granulociti, ma soprattutto, importante nel nostro caso, monociti/macrofagi.

3.9 Prelievo e preparazione degli splenociti

Le milze sono state prelevate in maniera sterile (**Figura 3.15**) e poste in capsula Petri contenente circa 10 ml di DMEM al 10 % di siero fetale bovino. L'organo è stato poi omogeneizzato mediante pressione con stantuffo di siringa e le cellule, una volta filtrate, sono state poste in tubo Falcon da 50 ml. Dopo centrifugazione a 250xg per 7 minuti, si sono lisati i globuli rossi con cloruro d'ammonio e si è proceduto con conteggio delle cellule mediante Trypan Blue.

Per differenziare i linfociti T dai linfociti B si è ricorsi a colonna in lana di vetro. Tale metodica permette di eluire dalla colonna i linfociti T mentre i linfociti B rimangono vincolati alla lana di vetro con buona sensibilità (70%); tale effetto risulta dall'espressione di molecole di adesione da parte dei linfociti B assenti invece nei linfociti T.

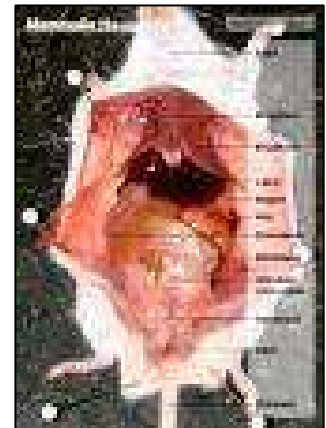


Figura 3.15 Laparotomia esplorativa di *Mus Musculus*

3.10 Proliferazione linfocitaria mediante timidina triziata 3(H)T

La valutazione della proliferazione linfocitaria ha richiesto 2×10^6 linfociti per pozzetto in piastra da 96 pozzetti, ai quali, sono stati aggiunti nel terreno di coltura $50 \mu\text{Ci}$ /pozzetto di timidina triziata. Dopo 18 ore di incubazione in termostato a CO_2 al 10%, si è proceduto alla raccolta delle cellule su carta Filtermat attraverso Harvester 96 Mach 3 (Tomtec, Orange, CT, USA).

Dopo aver asciugato il filtro, si è proceduto con aggiunta di scintillante; tale sostanza, imbibendo la carta, determina una emissione di radiazioni proporzionali alla quantità di timidina triziata inglobata dalle cellule durante i cicli replicativi.

Le radiazioni emesse sono state rilevate mediante scintillatore MicroBeta. I risultati sono stati espressi come conteggio per minuto (CPM).

3.11 Quantificazione proteica con metodo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

ELISA è l'acronimo dell'espressione inglese Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, un metodo di analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di un dato antigene caratteristico di un organismo patogeno o, come nel nostro caso, una proteina di interesse all'interno di un campione. Nel nostro caso tale metodica è stata utilizzata per valutare la concentrazione di citochine all'interno del surnatante derivante da cellule in coltura. Si è andati ad applicare una un test ELISA di tipo non competitivo di tipo diretto

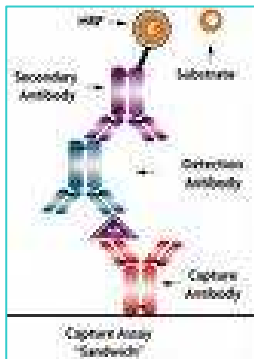


Fig 3.16 Schema del legame fra anticorpo primario (rosso), antigene (azzurro), anticorpo secondario (viola) coniugato all'enzima e substrato (giallo) che si viene a creare in corso di test ELISA

Brevemente, il protocollo prevede l'immissione di una soluzione dell'anticorpo primario, specifico per l'antigene da individuare, nei pozzetti di una apposita piastra da saggio in polistirene, con saturazione del fondo del pozzetto con l'anticorpo, e lavaggio con soluzione tampone; L'anticorpo primario aderisce al fondo dei pozzetti per mezzo solitamente di gelatina e l'eccesso viene lavato via mediante soluzione di lavaggio. La saturazione dei siti liberi sulla superficie della vaschetta di reazione avviene con l'aggiunta di una proteina non reattiva (albumina di siero bovino) per impedire l'adsorbimento dell'anticorpo alla superficie della vaschetta.

In seguito si ha l'aggiunta dei campioni dei quali bisogna saggiare la presenza o meno, dell'antigene caratteristico e degli standard a concentrazione nota. L'antigene, se presente, si lega specificamente con l'anticorpo e l'eccesso viene lavato via.

Si deve quindi aggiungere l'anticorpo secondario, tipicamente modificato e coniugato con un enzima solitamente costituito da perossidasi o fosfatasi alcalina. Si ha quindi la rilevazione del complesso antigene-anticorpo mediante aggiunta del substrato dell'enzima coniugato all'anticorpo secondario: si sceglie un substrato sintetico (p-nitrofenilfosfato) tale per cui il prodotto della reazione con l'enzima coniugato all'anticorpo secondario è colorato (tipicamente è giallo per la fosfatasi alcalina o rosso per la perossidasi): la presenza del complesso antigene-anticorpo primario viene rilevata attraverso lo sviluppo del colore. L'intensità del colore dipenderà, a parità di tempo di incubazione, dal numero di complessi presenti (**Fig 3.16**).

L'aggiunta di idrossido di sodio o acido cloridrico blocca la reazione tra enzima fosfatasi e p-nitrofenilfosfato.

La lettura della piastra come risultato dell'espressione della reazione attraverso uno spettrofotometro avviene a determinate lunghezze d'onda (450nm).

L'assenza del colore giallo indica l'assenza del complesso antigene-anticorpo primario nel campione analizzato mentre l'intensità del colore giallo nei diversi pozzetti della piastra ELISA è proporzionale al numero di complessi antigene-anticorpo (primario) formati e quindi alla concentrazione dell'antigene (in grado di legare l'anticorpo primario) nel campione analizzato (**Figura 3.17**).



Fig. 3.17 Piastra allestita con metodica ELISA pronta per la lettura allo spettrofotometro

3.12 Quantificazione citochinica mediante Bioplex (Bio Rad)

Il surnatante prelevato dalle colture cellulari è stato sottoposto a metodica di valutazione citochinica tramite Bioplex (Bio-Rad).

Il principio di tale dosaggio prevede una anticorpo specifico coniugato a biglie in grado di emettere fluorescenza a diverse lunghezze d'onda quando rilevate da streptavidina.

Il principio è uguale a quello dell'ELISA ma la possibilità da parte del detector di rilevare diverse lunghezze d'onda permette di quantificare contemporaneamente più parametri all'interno della stessa matrice. Le fluorescenze rilevate vengono poste in relazione alle fluorescenze emesse da campioni a concentrazione nota. Sulla base di questi viene estrapolata la concentrazione di citochine nei campioni a concentrazione ignota.



3.13 Citometria a flusso

Fin dall'inizio degli anni Cinquanta, la citometria a flusso è diventata una tecnologia altamente raffinata per l'esplorazione delle superfici delle cellule, in un modo veloce e molto preciso. Per mezzo della citometria a flusso, è ormai possibile raccogliere le informazioni concernenti le molecole della superficie cellulare e la loro espressione durante la differenziazione cellulare, studiare il ciclo cellulare attraverso la valutazione quantitativa delle modificazioni nel contenuto di DNA, svolgere studi funzionali di una varietà di parametri cellulari e ottenere delle popolazioni arricchite di cellule per ulteriori studi. In ogni caso la citometria a flusso, nelle sue applicazioni più diffuse, appare indissolubilmente legata allo studio di cellule, dal punto di vista strutturale e funzionale.

Il citometro di flusso può pertanto essere concepito come un analizzatore multiparametrico in grado di effettuare simultaneamente il dosaggio di *differenti analiti*, in un *singolo campione*, attraverso un *singolo processo di misurazione*. Il limite applicativo della citometria, fino ad oggi, era rappresentato dall'assoluta necessità di disporre di una struttura di dimensioni ottimali (leggi cellula), che funzionasse da "carrier" per l'analita d'interesse. Nuovi spazi sono stati comunque conquistati in ambiti particolari molto diversi dall'immunofenotipizzazione o dall'analisi della ploidia del DNA, La rilevazione delle molecole delle membrane cellulari, esposte sulla superficie cellulare, è facile da compiere, in quanto sono subito disponibili queste molecole per gli anticorpi monoclonali. Un problema più complesso era quello di legare gli anticorpi monoclonali agli antigeni localizzati all'interno della cellula: si richiedeva che l'anticorpo monoclonale fosse introdotto nella cellula conservando contemporaneamente l'integrità della membrana cellulare affinché il tipo cellulare fosse determinabile per mezzo dell'identificazione degli antigeni superficiali. La soluzione per questo problema è arrivata con la dimostrazione che gli anticorpi monoclonali potrebbero essere introdotti nella cellula modificando l'integrità della membrana con una fissione di luce che non distrugga in modo significativo gli antigeni superficiali. Lo sviluppo di questa tecnica ha consentito lo studio delle molecole intracellulari, come le citochine, nelle varie cellule, contribuendo così alla nostra comprensione delle funzioni cellulari per mezzo della misurazione sequenziale di molecole che vengono espresse mentre la cellula o si differenzia o si metabolizza.

3.13.1 Basi tecniche di citometria a flusso

Il citometro a flusso permette la misurazione rapida della luce deviata e della fluorescenza emessa da cellule opportunamente illuminate. Le cellule, o le particelle, sono sospese in un mezzo liquido e producono segnali quando attraversano un fascio di luce.

La luce diffusa e la fluorescenza emessa da ciascuna particella sono raccolte da specifici dispositivi opto-elettronici, che le convertono in segnali analogico-digitali, ed inviate ad un computer, ove la distribuzione del segnale viene rappresentata con istogrammi di frequenza o citogrammi, facendo riferimento a differenti parametri. La luce diffusa nella stessa direzione della luce incidente è collegata alla dimensione della cellula (Forward Scatter, FSC) (**Fig 3.18**), mentre la luce diffusa con un angolo di 90° fornisce informazioni relative alla complessità strutturale della particella (Side Scatter, SSC) (**Fig 3.18**).

Quest'ultimo parametro è correlato alle caratteristiche di rugosità della superficie cellulare e al numero di organuli presenti nella cellula. La dimensione e la complessità sono considerati parametri intrinseci dal momento che possono essere ottenuti senza sottoporre il campione a particolari procedure di marcatura.

Al fine di ottenere altre informazioni, i campioni possono essere opportunamente trattati con differenti fluorocromi liberi o coniugati con idonei anticorpi monoclonali.

Tali sostanze possono essere classificate in base al loro meccanismo d'azione: alcuni sono in grado di aumentare la loro fluorescenza legandosi a specifici componenti cellulari come proteine (*fluorescina iso-tiocianato, FITC*), acidi nucleici (*ioduro di propidio, PI*), e lipidi (*Rosso Nilo*).

La fluorescenza di altri fluorocromi dipende da attività enzimatiche (substrati fluorogenici) come esterasi, perossidasi e peptidasi (Figura 3.19). I fluorocromi possono essere anche coniugati a sonde nucleotidiche per identificare sequenze di DNA o RNA.

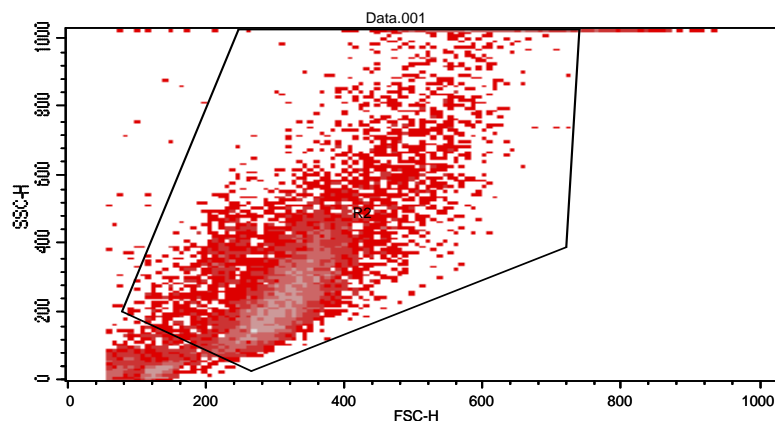


Figura 3.18 Schema relativo al sistema opto elettronico per la rilevazione dei segnali di Forward Scatter (FSC) e Side Scatter (SSC).

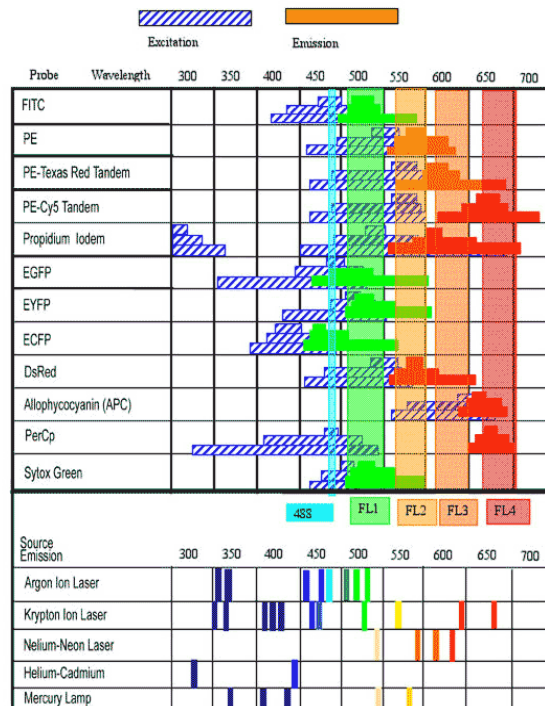


Figura 3.19. Spettri di eccitazione e di emissione di alcuni dei fluorocromi di più ampio impiego (tratto da Practical Flow Cytometry, Third Edition, Howard M. Shapiro. P. 245).

Un citometro a flusso è costituito da tre componenti principali: un sistema fluidico che controlla la captazione cellulare e il flusso cellulare; un sistema ottico che “interroga” le cellule mentre attraversano un raggio laser; e un sistema elettronico che controlla gli strumenti e raccoglie, raffigura ed analizza i dati.

Le cellule vengono introdotte come una sospensione a cellule singole in un flusso di soluzione clorurata isotonica e viaggiano come “un flusso dentro un flusso”, per mettersi in linea e passare attraverso un beccuccio in fila. Mentre procedono, e mentre vengono alla fine espulse oppure recuperate (vale a dire la separazione per i tipi specifici delle cellule), attraversano un raggio di luce che “interroga” ogni cellula per quanto riguarda le caratteristiche richieste. Le fonti di luce più impiegate sono i laser a gas, preferibilmente quello di argon perché emette, a 488 nm, una linea di luce di eccitazione utile con i fluorocromi più comuni in uso attualmente. Nel componente elettronico di un emicitometro a flusso, il segnale di luce emesso da una cellula alla sede di interrogazione viene convertito in un impulso elettrico (più comunemente sarà un segnale analogico). I segnali analogici sono poi convertiti nei segnali digitali che vengono raffigurati su uno schermo da un tubo a raggi catodici. L’avvento di computer sempre più potenti ha consentito l’introduzione di sistemi computerizzati per controllare l’operazione degli emicitometri a flusso, nonché per la raccolta, la memorizzazione e l’analisi dei dati. Cellule singole sono richieste per le misurazioni della citometria a flusso e questo rappresenta un fattore limitante che previene gli studi dei tessuti che non possono venire facilmente dispersi in una sospensione di cellule singole.

I campioni sono solitamente sospesi in una soluzione clorurata tamponata con il fosfato, 0,2% di albumina di siero bovino e 0,01% di sodio azide (PBS). A seguito dell’esposizione all’anticorpo monoclonale adatto per 30 minuti al buio, per evitare la riduzione di radiazioni fluorescenti, i campioni vengono lavati, risospesi in PBS ed esaminati nell’emicitometro a flusso. Può essere utile ricordare alcuni principi fondamentali per la manipolazione dei campioni. Nella pratica clinica, i campioni più comuni sono il sangue periferico, aspirati di midollo osseo, o sospensioni cellulari monodisperse dai linfonodi.

Nelle situazioni di ricerca, il campione può essere di qualsiasi tipo di cellula sospesa in uno stato monodisperso. Per il sangue periferico e per il midollo osseo è necessario eliminare gli eritrociti per mezzo di un agente lisante (di solito cloruro di ammonio) che non influenzerà le cellule mononucleate soggette all'esame.

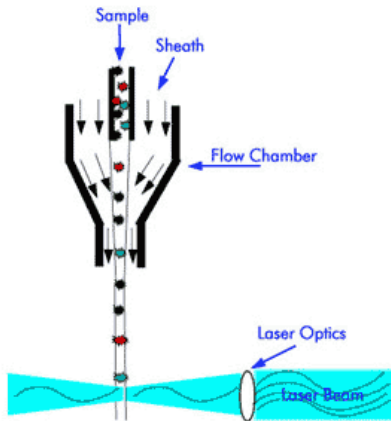


Figura 3.20 Cella di flusso in cui fluiscono le cellule.

Tornando alle componenti necessarie per un'analisi citofluorimetrica riconosciamo:

(i) Il sistema idraulico produce un flusso laminare intorno alla sospensione cellulare (*hydrodynamic focusing*), permettendo il passaggio delle particelle ad una velocità costante, allineate lungo un identico asse, attraverso il punto di rilevazione (cella di flusso) (**Fig. 3.20**).

(ii) Il sistema di illuminazione consiste di un fascio di luce che incide sul materiale in sospensione e che permette di produrre segnali di rifrazione della luce e/o emissione di fluorescenza. Nella camera a flusso, le cellule fluiscono in fila indiana e quando una delle cellule interseca con il raggio laser (punto d'interrogazione) la luce, colpendo la cellula, viene dispersa in ogni direzione. La luce dispersa in avanti (un'indicazione delle dimensioni della cellula) e quella dispersa verso i lati (un'indicazione della struttura interna della cellula) sono raccolte dai tubi foto-moltiplicatori che amplificano il debole segnale di luce. I segnali di luce sono poi processati come descritto sopra e raffigurati come puntini sullo schermo: ognuno rappresenta un evento come determinato dalle proprietà della dispersione di luce possedute dalla cellula. Una distribuzione sarà quindi ottenuta, dai gruppi di puntini che rappresentano popolazioni distinte di cellule, con diverse dimensioni e varie strutture interne (un citogramma o "bit map"). A questo punto, necessita delineare la popolazione di cellule che sta per essere esaminata ulteriormente, per determinare le caratteristiche soggette allo studio per mezzo dei segnali fluorescenti emessi dagli anticorpi monoclonali legati agli antigeni della superficie della cellula. Questo viene compiuto ponendo una finestra elettronica ("gate") intorno al gruppo di nostro interesse .

(iii) Il sistema ottico canalizza la luce incidente sulle particelle che l'attraversano, registra la luce diffusa e la fluorescenza emessa dai fluorocromi, dirigendole entrambe verso appropriati dispositivi opto-elettronici, ovvero i tubi fotomoltiplicatori. Sostanzialmente tutti i citometri che utilizzano una sorgente laser hanno un sistema ottico di tipo ortogonale, in cui i tre assi principali dello strumento, ovvero il flusso idrodinamico, il fascio di luce laser e l'asse ottico per la rilevazione del segnale fluorescente sono distribuiti ad angolo retto uno rispetto all'altro. Il raggio laser è focalizzato sul campione grazie all'impiego di opportune lenti.

(iv) Il sistema elettronico trasforma la luce diffusa e la fluorescenza in impulsi elettrici (analogici). Le ampiezze di tali impulsi vengono distribuite elettronicamente in canali, permettendo la creazione di istogrammi che rappresentano il numero di cellule contro il numero di canali (**Fig 3.21**). Lo strumento è anche in grado di controllare il processo di separazione (sorting) di diverse popolazioni cellulari all'interno del medesimo campione. Tale processo,

attivato dalla fluorescenza, consente di separare fisicamente una particolare tipologia cellulare in base a caratteristiche peculiari della popolazione stessa.

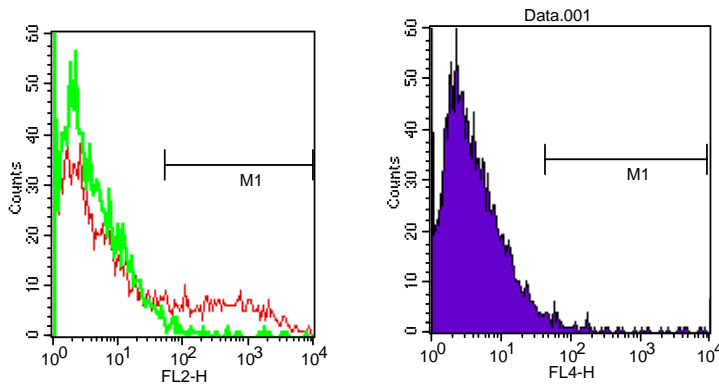


Figura 3.21 Distribuzione della popolazione cellulare in relazione ad un determinato citofluoro. M1 rappresenta la percentuale di cellule fluorescenti rispetto al controllo isotipico; tale parametro deve essere settato in modo da ottenere valori inferiori al 2%.

(v) Il sistema di analisi dei dati consiste di un software che permette l'analisi di una grande quantità di informazioni ricevute dall'acquisizione di dati multiparametrici. Esiste un'ampia varietà di software offerta dai diversi fabbricanti degli emocitometri a flusso per l'elaborazione di dati. Negli ultimi anni ci sono stati tanti progressi nella produzione di software, sempre migliore e sempre più facile da usare, che consente agli operatori di osservare e di modificare la raffigurazione dei dati mentre i campioni vengono processati. I dati acquisiti possono anche essere trasferiti ad un altro computer per continuare l'analisi a distanza dall'emocitometro a flusso.

Un problema particolarmente scottante era presentato dalla possibilità di analizzare i prodotti cellulari in soluzione, piuttosto che dentro le cellule. Nei ultimi anni, come risposta a questo problema, è stata proposta una tecnica che prevede l'utilizzo di grani o perline di plastica rivestiti con un anticorpo monoclonale mirato al prodotto da rilevare. I grani sono poi trattati con lo stesso anticorpo monoclonale marcato con un fluorocromo ed esaminati in un emocitometro a flusso. La fluorescenza presente sui grani indica la captazione del prodotto da rilevare da parte del grano, e la captazione susseguente del monoclonale fluorescente da parte del prodotto legato al grano. E' ormai possibile, mediante grafiche di calibrazione, rilevare, in modo quantitativo, i prodotti cellulari in fluidi a livello pg. E' interessante notare che la combinazione della rilevazione a grano di un prodotto extracellulare solubile, alla rilevazione dello stesso prodotto all'interno della cellula, può fornire dati preziosi sull'accumulo e sull'espressione del prodotto e la sua secrezione, in tal modo consentendo gli studi cinetici sulle cellule attivate.

3.14 Analisi Statistica

L'analisi statistica nelle corso delle varie sperimentazioni e per i differenti parametri è stata effettuata con il software informatico GraphPad Prism 4.00 per Windows, GraphPad software, S Diego, California, USA. In particolare per ogni argomento di indagine sono stati utilizzati diversi modelli di elaborazione statistica come descritto specificatamente di seguito. Il livello di significatività attendibile è stato attribuito a $p < 0,05$ o $p < 0,01$.

4. SPERIMENTAZIONI REALIZZATE

4.1 Sperimentazione 1

Ruolo esercitato da recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi di tipo alfa (PPAR- α) nella regolazione dell'infiammazione acuta

4.1.1 INTRODUZIONE

Il processo infiammatorio è caratterizzato dalla produzione di prostaglandine, leucotrieni, istamina, bradichinina, fattore di attivazione piastrinico e dal rilascio di sostanze da tessuti e dalle cellule migranti (Tomlinson *et al.*, 1994). L'infiammazione localizzata indotta da carragenina è comunemente usata per valutare l'attività dei composti antinfiammatori non steroidei (NSAID) ed è un modello utile per valutare il contributo dei mediatori coinvolti nei cambiamenti a livello vascolare associati all'infiammazione acuta.

In particolare, la fase iniziale dell'infiammazione acuta (0-1h), che non è inibita da NSAID quali indometacina o acido acetilsalicilico, è dovuta al rilascio di istamina, 5-idrossitriptamina e bradichinina, seguita da una fase successiva (1-6 hrs) legata principalmente al rilascio di prostaglandina e, secondo studi più recenti (Nantel *et al.*, 1999), dovuta anche all'induzione di COX-2 nel tessuto. Sembra che l'instaurarsi dell'infiammazione acuta da carragenina sia legata all'infiltrazione dei neutrofili e la produzione di radicali liberi di derivazione neutrofilica, quali l'idrogeno perossido, superossido, radicale idrossilico e il rilascio di altri mediatori sempre derivanti da neutrofili (Salvemini *et al.*, 1996).

I recettori PPAR sono membri della superfamiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione ligando-attivati, che sono correlati ai recettori retinoidei, steroidei e dell'ormone tiroideo. La sottofamiglia dei PPAR comprende 3 membri: PPAR- α , PPAR- β e PPAR- γ (Murphy *et al.*, 2000). La denominazione PPAR è dovuta al fatto che l'attivazione di PPAR- α da parte di xenobiotici determina la proliferazione dei perossisomi negli epatociti murini.

Nei ratti, PPAR- α è espressa in maggiori quantità nel tessuto adiposo bruno, seguito da fegato, rene, cuore e muscolo scheletrico (Wayman *et al.*, 2001). PPAR- α si lega a diversi ligandi, quali i metaboliti dell'acido arachidonico (prostaglandine e LT) e fibrati (molecole di sintesi) come clofibrato, fenofibrato e bezafibrato (Sher *et al.*, 1993). Sebbene PPAR- α sia stato meno studiato rispetto a PPAR- γ , è stato dimostrato che anche i ligandi di PPAR- α regolano la risposta infiammatoria (Lovett-Racke *et al.*, 2004). Recenti ricerche hanno chiaramente indicato che PPAR- γ e PPAR- α sono espressi sui linfociti e che i loro ligandi possono inibire la produzione di IL-2 e conseguentemente la proliferazione dei linfociti T (Cunard *et al.*, 2002; Marx *et al.*, 2002).

Inoltre, noi ed altri AA abbiamo chiaramente dimostrato che topi privi di PPAR- α hanno risposte abnormalmente prolungate nei confronti di differenti stimoli infiammatori (Devchand *et al.*, 1996; Cuzzocrea *et al.*, 2004).

Dato che per il PPAR- α non è stato identificato alcun ligando naturale con un'elevata affinità specifica, è stato suggerito che il ruolo fisiologico del recettore sia di direzionare il flusso totale degli acidi grassi introdotti con la dieta nei tessuti chiave. I fibrati, invece, rappresentano i ligandi di sintesi di PPAR- α , che media l'attività di queste molecole, cioè la diminuzione della lipidemia (Staels *et al.*, 1998).

Recentemente, è stato evidenziato che i fibrati hanno proprietà antinfiammatorie *in vitro* (Takano *et al.*,2000; Okamoto *et al.*,2005) e *in vivo* (Lovett-Racke *et al.*, 2004; Delerive *et al.*,1999)

In particolare, si è dimostrato che questi ligandi di PPAR- α possono inibire l'espressione di diversi geni che codificano per fattori con attività proinfiammatoria, come IL-6, VCAM (vascular cell adhesion molecule) e COX2 in risposta all'attivazione citochinica (Delerive *et al.*, 1999). In più, è stato dimostrato che l'effetto antinfiammatorio dei ligandi di PPAR- α dipende anche, in parte, dall'inibizione dell'attivazione del fattore nucleare (NF)- κ B, tramite aumento dell'espressione dell'inibitore di κ B α (I κ B α) (Spencer *et al.*,1997; Delerive *et al.*,1999). E' importante sottolineare come queste molecole possano avere effetti molteplici e per esplicare la loro attività possano usare vie diverse da quella PPAR- α dipendente (Hill *et al.* 1999, Dyroy *et al.*, 2005).

Tra i fibrati è stata identificata la molecola Wy14,643, che, come GW7647, mostra un'elevata selettività per PPAR- α murini e umani (Jackson *et al.*, 1997). Altri studi hanno anche dimostrato come Wy14,643 presenti un potente effetto antinfiammatorio in diversi modelli di infiammazione (Cuzzocrea *et al.*, 2000).

Tuttavia il ruolo del recettore PPAR- α in condizioni sperimentali di infiammazione acuta non è ancora stato investigato. Il presente studio è stato progettato per comprendere meglio la possibile influenza di PPAR- α in modelli murini dell'edema degli arti e di lesione polmonare.

4.1.2 MATERIALI E METODI

Animali

I topi del peso di circa 22 grammi e dell'età di circa 5 settimane knockout per il gene codificante per PPAR- α (PPAR- α KO) e topi wild type utilizzati come controllo sono stati acquistati da Jackson Laboratories (Harlan Nossan, Italy). I topi geneticamente modificati apparivano in salute per quanto concerne i parametri clinici e comportamentali. essi sono stati stabulati in ambiente controllato e sono stati messi a loro disposizione acqua e cibo ad libitum.

Il benessere animale è stato rispettato rispettando le normative vigenti italiane (D.M. 116/92) e comunitarie (O. J. of E.C.L 358/1 12/18/1986) per quanto concerne gli animali da sperimentazione.

Gruppi sperimentali con edema plantare indotto da iniezione di carragenina

I topi sono stati collocati in maniera random nei seguenti sottogruppi

(i) gruppo **WT**. topi *wild type* (WT) in cui sono stati iniettati 0.1 ml di soluzione salina sterile a livello plantare del cuscinetto di destra addizionata di λ carragenina all'1% (10 soggetti);

(ii) gruppo **PPAR- α KO**. topi PPAR- α KO in cui sono stati iniettati 0.1 ml di soluzione salina sterile a livello plantare del cuscinetto di destra addizionata di λ carragenina all'1% (10 soggetti);;

(iii) gruppo **WT sham di controllo**. topi WT in cui è stato somministrato un uguale volume di soluzione salina sterile **priva** dell'1% di λ -carragenina (10 soggetti);

(iv) gruppo **PPAR- α KO sham di controllo**: topi PPAR- α KO in cui è stato somministrato un uguale volume di soluzione salina sterile **priva** dell'1% di λ -carragenina (10 soggetti);

Edema del polpastrello carragenina indotto

L'edema del polpastrello mediante iniezione di λ Carragenina all'1% è stato indotto come precedentemente descritto (Cuzzocrea *et al.*, 2000) mediante iniezione di 0.1 ml di soluzione salina sterile a livello sottopiantare del cuscinetto di destra addizionata contenente λ carragenina all'1%.

Il volume del polpastrello è stato misurato con plessimetro (Basile, Italia) come precedentemente descritto (Cuzzocrea *et al.*, 2000) immediatamente dopo l'iniezione e ad intervalli di 60 minuti fino a 5 ore dopo. L'incremento di volume del polpastrello è stato imputato all'edema conseguente all'iniezione.

Gruppi sperimentali con pleurite indotta da iniezione di carragenina

I topi sono stati collocati in maniera random nei seguenti sottogruppi

(i) gruppo **WT**. topi *wild type* (WT) in cui sono stati iniettati 0.1 ml di soluzione salina sterile a livello toracico addizionata di λ carragenina all'1% (10 soggetti);

(ii) gruppo **PPAR- α KO**. topi PPAR- α KO in cui sono stati iniettati 0.1 ml di soluzione salina sterile a livello toracico addizionata di λ carragenina all'1% (10 soggetti);;

(iii) gruppo **WT sham di controllo**. topi WT in cui è stato somministrato un uguale volume di soluzione salina sterile **priva** dell'1% di λ -carragenina (10 soggetti);

(iv) gruppo **PPAR- α KO sham di controllo**: topi PPAR- α KO in cui è stato somministrato un uguale volume di soluzione salina sterile **priva** dell'1% di λ -carragenina (10 soggetti);

Pleurite indotta da carragenina

La pleurite indotta da carragenina ha seguito protocolli precedentemente illustrati (Mullane *et al.*, 1985). I topi sono stati anestetizzati con isofluorano e sottoposti ad incisione a carico sesto spazio intercostale di sinistra. Il sottostante strato di muscolatura è stato divaricato e 0,2 ml di soluzione salina o soluzione salina contenente 1% (w/v) λ -carrageenan (0.2 ml) sono stati iniettati a livello di cavità pleurica.

La soluzione di continuo creata a livello cutaneo è stata suturata dopo di che gli animali sono stati ricoverati. Dopo 4 ore dall'iniezione gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia mediante inalazione di CO.

Il torace è stato aperto con molta cura e si è proceduto al risciacquo della cavità pleurica con 2 ml di soluzione salina contenente eparina (5 U/ml) ed indometacina (10 μ g/ml). L'essudato e la soluzione di risciacquo sono state rimosse mediante aspirazione, e il volume totale è stato calcolato sottraendo dal volume totale i 2 ml utilizzati per sciacquare. Qualsiasi essudato contenesse sangue è stato eliminato. .

I leucociti presenti nell'essudato sono stati risospesi in soluzione salina (PBS; 0.01 M, pH 7.4) e contati con microscopia ottica in camera di Burker mediante colorazione vitale Trypan Blue.

Real Time PCR

Una quantità nota (75 mg) di tessuto polmonare è stato omogenizzato in una soluzione di Tri reagent in accordo con le istruzioni fornite dal produttore (Sigma, Deisenhofen, Germany). L'RNA totale cellulare è stato isolato dalla fase acquosa procedendo alla quantificazione dell'RNA messaggero codificante per interleuchina 1 beta (IL 1 β), e Tumor Necrosis Factor alfa (TNF α) mediante PCR real time di tipo quantitativo.

La quantità di ogni citochina è stata normalizzata attraverso il rapporto con il gene housekeeping gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GADPH).

L'RNA estratto da ogni singolo midollo spinale è stato retrotrascritto in cDNA complementare a singolo filamento mediante *Random Hexamers* con l'uso di trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi aviaria (Takara, Japan) in 20 μ l di reazione dopo trattamento con DNasi e stoccaggio in freezer a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La coppia di primer per ogni citochina è stata disegnata mediante software Oligo (Molecular Biology Insights, Cascade, Colorado) (Tabella 1). La reazione di amplificazione ha seguito i seguenti parametri: uno step di denaturazione per 15 minuti a 95°C seguito da 40 cicli di denaturazione (94°C per 30 sec), 30 sec di annealing (TNF α a 61°C, IL 1 β a 61°C, GADPH a 56 °C), 15 sec a 72 °C seguiti da una estensione finale di 7 minuti a 72°C. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro mediante elettroforesi. Gli amplificati purificati sono stati clonati all'interno di un vettore plasmidico, trasformati in E coli TOP 10 (Invitrogen) e purificati con Turbo kit (QBIogene, Irvine, California). Il plasmide ricombinante è stato linearizzato mediante taglio di sequenza target con l'enzima di restrizione *PmeI* (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Almeno 6 diluizioni in base 10 di tale plasmide tagliato sono state utilizzate come campioni a concentrazione nota in corso di ogni singola Real Time.

Tutte le reazioni di Real Time PCR sono state messe a punto con il rotore Rotor-Gene 3000 System (Corbett Research, Australia). Le amplificazioni sono avvenute in un volume totale di 25 μ l contenente i reagenti come descritto di seguito; 1X di SYBR PREMIX Ex Taq Takara, 200 nM per ogni primer *forward* e *reverse*, 1X di Rox Reference Dye e 2 μ l di cDNA come raccomandato dal protocollo del produttore. I parametri di ogni ciclo sono stati i seguenti: 10 min a 95°C per l'attivazione della polimerasi seguiti da 40 cicli di 15 sec a 95°C, 15 sec di annealing (differenti a seconda della coppia di primers considerati), 20 sec a 72°C.

Il segnale di emissione della fluorescenza è stato rilevato sul canale FAM (multichannel machine) (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) con una fluorescenza rilevata a partire dal termine dello step a 72°C di ogni ciclo.

E' stata tracciata una curva di melting dopo l'amplificazione mantenendo la temperatura a 72°C per 12 s seguiti da gradualmente aumenti di 0,1°C/s fino a raggiungere i 95°C, con l'acquisizione della fluorescenza in ogni step sul FAM channel (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5).

Il test della temperatura di melting del prodotto di reazione può ovviare al problema della fluorescenza data dai prodotti di reazione aspecifici.

Citochina	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
GADPH	aacatcatcctgcatcca	cagatccacgacggacaca	123
TNF α	catcttctcaaaattcgagtgacaa	gggttgatcttctactccca	175
IL 1 β	caaccaacaagtgatattctccatg	gatccacactctccagctgca	152

Tabella 1 Primer selezionati per l'amplificazione dei gene target in corso di Real Time PCR.

Nel corso della medesima sperimentazione sono stati valutati altri parametri coinvolti nell'infiammazione mediante altre tecniche di laboratorio o evidenziazioni cliniche quali:

- monitoraggio dell'aumento volumetrico del polpastrello conseguente ad edema;
- quantificazione dell'essudato prodotto in sede polmonare;
- valutazione dell'attività mieloperossidasi (MPO);
- osservazione istologica delle biopsie prelevate a carico del polpastrello o biopsie polmonari;
- valutazione mediante colorazione immunoistochimica per FasL, IL 1 β e TNF α .

4.1.3 RISULTATI

Effetti del gene PPAR- α sull'edema degli arti indotto da carragenina

Una volta messo a punto il modello di risposta infiammatoria acuta (infiammazione degli arti carragenina indotta) (Hargreaves *et al.*, 1988), è stato investigato il ruolo del ligando del recettore PPAR- α nell'infiammazione acuta. Nel gruppo di topi di controllo WT (wild type) e nel gruppo di controllo di topi PPAR- α KO non è stata osservata alcuna formazione di edema degli arti (dati non mostrati). L'iniezione subplantare di carragenina in topi WT ha portato a un processo infiammatorio il cui sviluppo si è dimostrato essere direttamente proporzionale al tempo con un picco a 4-5 ore. L'assenza del gene PPAR- α funzionale nei topi PPAR- α KO ha comportato l'aumento della formazione di edema negli arti in tutti i tempi sperimentali considerati.

Successivamente, i tessuti degli arti sono stati esaminati per valutare l'attività della mieloperossidasi (MPO) quale indicatore di infiltrazione neutrofilica. Come mostrato in **figura 1b**, i livelli dell'attività della MPO sono significativamente aumentati ($P < 0.01$) negli arti del gruppo WT a 4 ore dopo l'iniezione di carragenina se comparati coi gruppi di controllo WT e PPAR- α KO. L'assenza del gene PPAR- α funzionale nei topi PPAR- α KO ha determinato un notevole aumento dell'attività della MPO (**fig 1b**).

Nei tessuti degli arti dei gruppi di controllo WT e PPAR- α KO non è stata osservata alcuna alterazione istologica (**fig 2a e 2b**). Al contrario, l'esame istologico di biopsie di tessuti degli arti di topi WT trattati con carragenina (**fig 2c**) ha evidenziato un notevole quadro infiammatorio, inclusa una marcata infiltrazione cellulare (**fig 2d**).

L'assenza di funzionalità del gene PPAR- α nei topi PPAR- α KO ha comportato un significativo aumento di cambiamenti patologici nei tessuti degli arti (**fig 2e**), inclusa una maggiore infiltrazione di cellule infiammatorie (**fig 2f**).

Il possibile ruolo del gene PPAR- α nell'apoptosi nell'infiammazione acuta è stato valutato con l'identificazione tramite metodica immunohistochemica del Fas ligando (FasL). Dai tessuti degli arti dei topi di controllo WT (**fig 3a**) e PPAR- α KO (**fig 3b**) non si è ottenuta alcuna colorazione positiva. A 4 ore dalla somministrazione di carragenina, la colorazione positiva per FasL è stata evidenziata nel tessuto infiammato degli arti di topi WT (**fig 3c**), localizzata soprattutto nelle cellule infiammatorie (**fig 3d**) infiltrate nel connettivo. La colorazione FasL positiva nelle cellule infiammatorie infiltrate nel tessuto connettivo (**fig 3e**) era significativamente aumentata nei topi PPAR- α KO a 4 ore dalla somministrazione di carragenina (**fig 3f**).

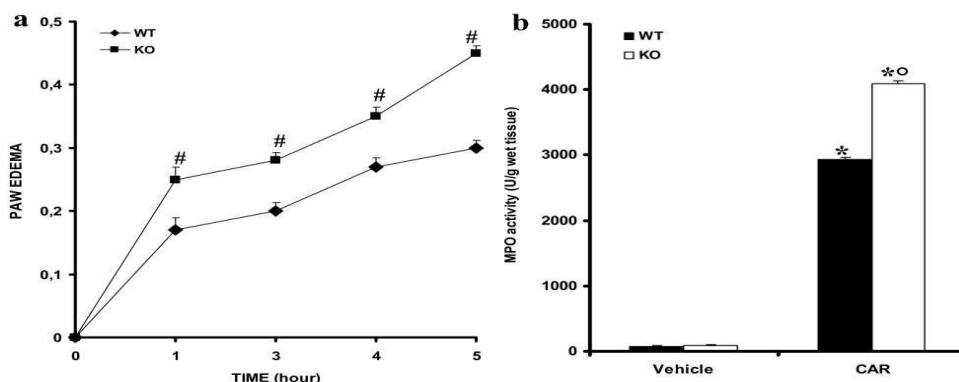


Fig. 1. Effetti del gene funzionale PPAR α nell'insorgenza di edema plantare del polpastrello (a) e nell'infiltrazione neutrofilica (b) indotte dall'iniezione sottopiantare di carragenina in topi. L'edema a carico del polpastrello è stato indotto dall'iniezione nel cuscinetto destro di 0.1 ml di soluzione salina sterile contenente l'1% di carragenina. Il volume del polpastrello è stato misurato prima dell'iniezione e ad intervalli di 1 ora per le 4 ore successive. La sua misurazione è espressa come differenza fra ogni singolo tempo sperimentale e il volume di partenza. Dopo 4 ore il tessuto del polpastrello è stato raccolto, pesato e analizzato per valutare l'attività mieloperossidasi (MPO). L'iniezione sottopiantare di carragenina in topi WT ha determinato una infiammazione crescente nel tempo, con un picco entro le 4-5 ore (a). L'attività MPO era notevolmente maggiore in polpastrelli di topi WT 4 ore dopo l'iniezione di carragenina (b). L'assenza del gene funzionale PPAR α determina un significativo aumento dell'edema carragenina indotto in tutti i tempi sperimentali (a). Inoltre l'attività MPO era notevolmente aumentata in topi PPAR- α KO trattati con carragenina (b). #, $P < 0.01$, versus gruppo carragenina WT ai tempi sperimentali indicati; *, $P < 0.01$, versus sham controllo; o, $P < 0.01$, versus gruppo carragenina WT.

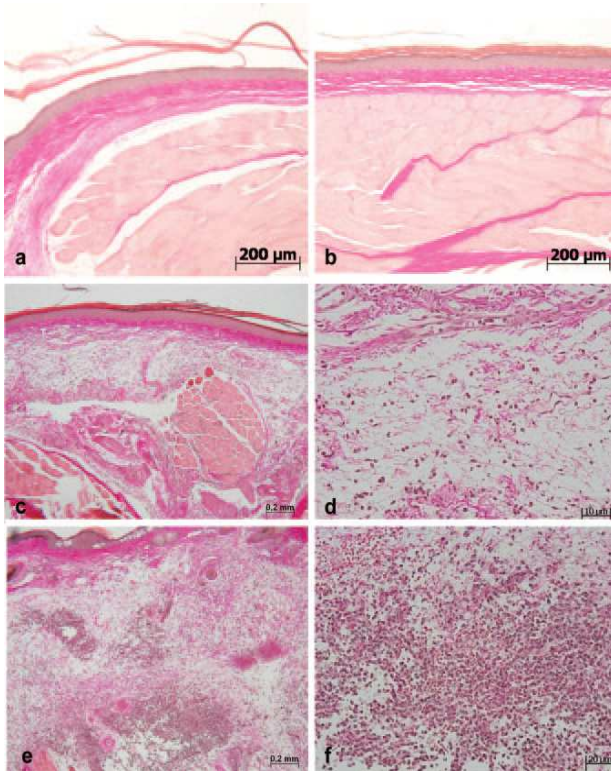


Fig. 2. Effetti del gene PPAR α su lesioni a carico del polpastrello.

Le biopsie del polpastrello sono state ottenute 4 ore dopo l'iniezione di carragenina. I tessuti sono stati colorati con colorazione tricromica. Non sono state osservate alterazioni nei tessuti raccolti da topi *wild type* di controllo (WT) (a) e da topi sham PPAR α (b). Al contrario significativi cambiamenti infiammatori sono stati rilevati in polpastrelli di topi prelevati da topi WT (c) associati a infiltrazione cellulare (d). L'assenza del gene funzionale PPAR- α in topi PPAR- α KO risulta in un significativo aumento del danno nel tessuto plantare (e) e al contempo della presenza di numerose cellule infiammatorie (f).

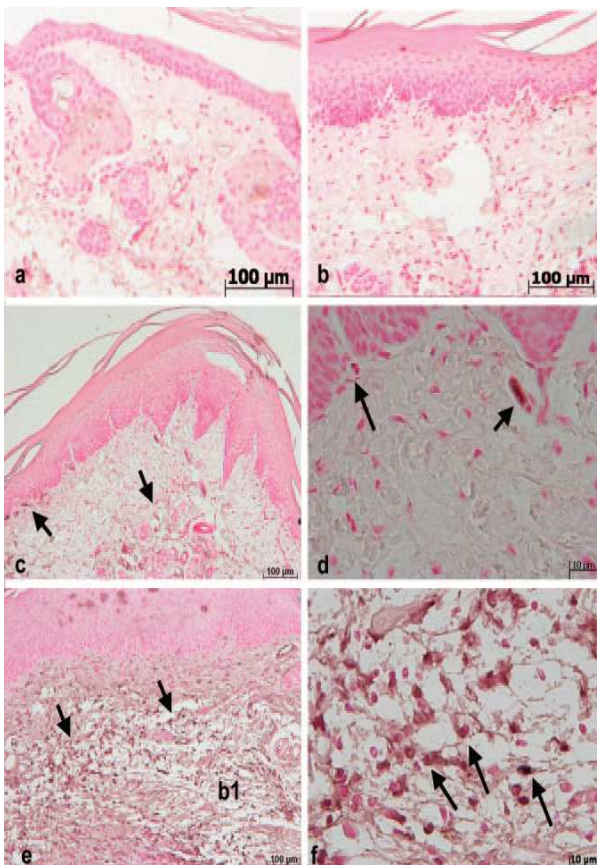


Fig. 3. Localizzazione immunohistochemica di FasL in polpastrelli di topo.

Le biopsie plantari sono state effettuate 4 ore dopo l'iniezione di carragenina. Le sezioni sono state incubate *overnight* con anticorpo anti-FasL (1:500 in PBS, v/v). Il counter-stain è stato sviluppato con DAB (brown color) e nuclear fast red (*background* rosso).

Non sono state rilevate colorazioni positive per FasL nel tessuto di topi WT sham (a) e da topi sham PPAR- α KO (b). Al contrario sono stati osservate colorazioni positive per FasL 4 ore dopo iniezione di carragenina nel tessuto plantare di topi WT (c), principalmente localizzate nelle cellule infiammatorie (d), infiltrate nel tessuto connettivo (vedi frecce).

L'assenza del gene funzionale PPAR- α in topi PPAR- α KO risulta in un significativo aumento della colorazione positiva per FasL delle cellule infiammatorie infiltrate nel tessuto connettivo (e e f, vedi frecce).

Effetti del gene PPAR- α sulla pleurite indotta da carragenina

Per analizzare il possibile ruolo del recettore PPAR- α durante l'infiammazione acuta nel polmone, è stato valutato l'effetto della delezione del gene PPAR- α in una pleurite carragenina indotta, a 4 ore dalla somministrazione di carragenina.

Tutti i topi WT in seguito a somministrazione di carragenina hanno sviluppato una pleurite acuta con la produzione di essudato torbido (**fig 4a**). Rispetto ai topi di controllo WT e PPAR- α KO, la somministrazione di carragenina in topi WT ha indotto un aumento significativo nel numero di cellule polimorfonucleate (PMNs) nello spazio pleurico (**fig 4b**). La presenza di essudato pleurico e il numero di cellule infiammatorie nella cavità pleurica erano significativamente aumentati a 4 ore dalla somministrazione di carragenina in assenza del gene PPAR- α funzionale nei topi PPAR- α KO.

La notevole presenza di cellule infiammatorie nella cavità pleurica è sembrata essere correlata al flusso dei leucociti nel tessuto polmonare. Quindi è stato investigato il ruolo del gene PPAR- α nell'infiltrazione di neutrofili misurando l'attività della MPO, che è risultata significativamente elevata ($P < 0.001$) a 4 ore dalla somministrazione di carragenina nei topi WT (**fig 4c**). Nei topi PPAR- α KO, l'attività nei polmoni di MPO era significativamente aumentata rispetto a quella negli animali WT (**fig 4c**).

Nei tessuti polmonari dei topi di controllo WT (**fig 5a**) e PPAR- α KO (**fig 5b**) non sono state osservate alterazioni istologiche. Al contrario, l'esame istologico di sezioni polmonari di tutti i topi WT trattati con carragenina hanno mostrato lesioni tissutali (**fig 5c**) e infiltrazione di cellule infiammatorie (**fig 5d**). I tessuti polmonari prelevati a 4 ore dalla somministrazione di carragenina in topi PPAR- α KO hanno mostrato un notevole aumento delle lesioni polmonari (**fig 5e**) così come una presenza significativa di cellule infiammatorie (**fig 5f**).

Per valutare la capacità del gene PPAR- α di modulare il processo infiammatorio regolando la secrezione di altre citochine, sono stati analizzati i livelli di citochine proinfiammatorie nei gruppi WT e PPAR- α KO. A 4 ore dalla somministrazione di carragenina, nell'essudato pleurico di topi WT è stato evidenziato un aumento significativo di TNF- α (**fig 6a**) e IL-1 β (**fig 6b**), tuttavia la produzione di questi fattori era maggiore nei topi PPAR- α KO rispetto ai WT.

In accordo con i risultati riscontrati per l'essudato pleurico, i tessuti polmonari dei topi WT trattati con carragenina hanno mostrato un aumento significativo dell'mRNA di TNF- α (**fig 6c**) e IL-1 β (**fig 6d**) rispetto ai topi di controllo WT e PPAR- α KO. I livelli dell'mRNA di TNF- α e IL-1 β nei polmoni di topi PPAR- α KO trattati con carragenina erano significativamente maggiori rispetto a quelli di topi WT misurati nelle stesse condizioni.

In seguito abbiamo valutato tramite immunistochemica l'espressione a livello polmonare di TNF- α e IL-1 β . Nei polmoni di topi di controllo WT e PPAR- α KO non è stata evidenziata positività per TNF- α (**fig 7a e 7b**). Al contrario, i tessuti di topi WT 4 ore dopo la somministrazione di carragenina hanno mostrato positività per TNF- α , localizzato nelle cellule infiammatorie infiltrate, negli pneumoniti, così come nella parete vascolare (**fig 7d**). Nei topi PPAR- α KO trattati con carragenina, la positività per TNF- α nelle cellule infiammatorie infiltrate, negli pneumoniti e nella parete vascolare (**fig 7f**) era significativamente superiore rispetto a quella nei topi WT.

In modo analogo, nessuna positività per IL-1 β è stata osservata nei polmoni dei topi WT di controllo (**fig 8a**) e topi PPAR- α KO di controllo (**fig 8b**). A 4 ore dalla somministrazione di carragenina, la positività per IL-1 β , localizzata nelle cellule infiammatorie infiltrate, negli pneumoniti, così come nella parete vascolare, è stata osservata in tessuti polmonari ottenuti da topi WT. Nei soggetti PPAR- α KO trattati con carragenina, questa positività per IL-1 β nelle cellule infiammatorie infiltrate, negli pneumoniti e nella parete vascolare (**fig 8e**) era significativamente maggiore rispetto a quella riscontrata nei topi WT.

Il potenziale ruolo del gene PPAR- α nell'apoptosi durante processi infiammatori polmonari acuti è stata valutata con l'evidenziazione tramite immunoistochimica del FasL. Dai topi di controllo WT e PPAR- α KO (fig 9a e 9b) non è stata evidenziata positività per FasL nei tessuti polmonari. A 4 ore dalla somministrazione di carragenina, positività per FasL è stata riscontrata nei polmonari di topi WT (fig 9c), localizzata specialmente nella parete vascolare e negli pneumoniti. Questa positività per FasL nella parete vascolare e negli pneumoniti era significativamente aumentata nei topi PPAR- α KO, cioè in assenza del gene PPAR- α funzionale. (fig 9d).

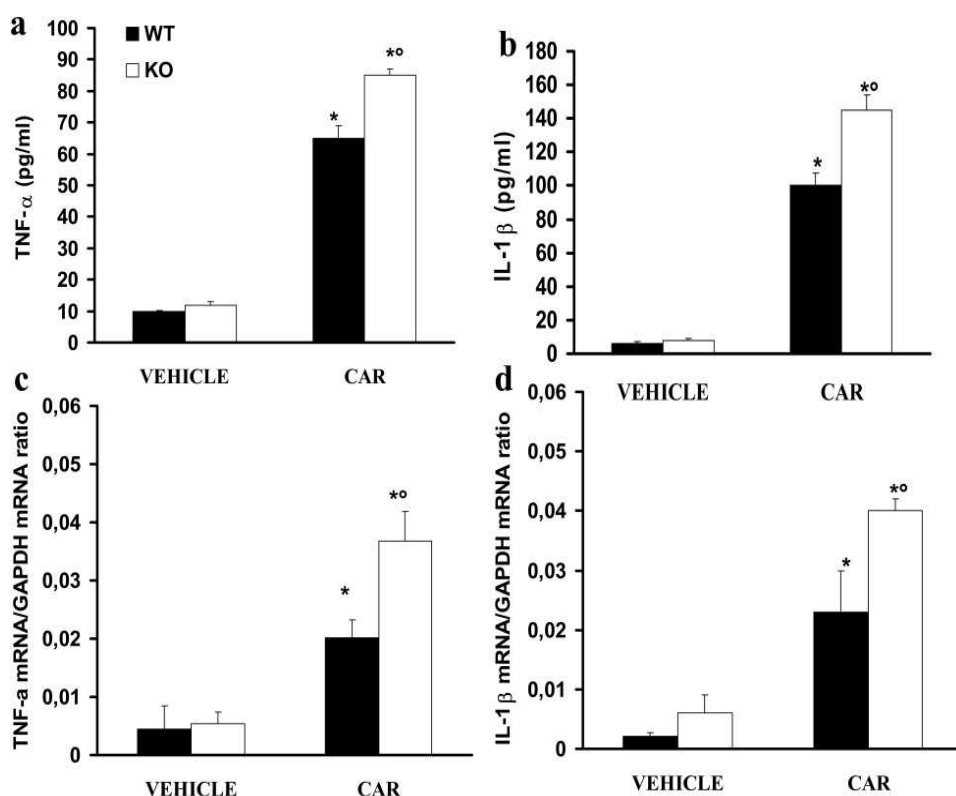


Fig. 6. Gli effetti del gene PPAR- α sulla produzione di TNF- α and IL-1 β sono stati valutati nell'essudato pleurale, e nel tessuto polmonare 4 ore dopo l'iniezione di carragenina utilizzando un kit commerciale ELISA colorimetrico per valutare la componente proteica, mentre l'RNA codificante per tali citochine è stato quantificato con Real Time PCR. Un significativa produzione di TNF- α (a) e IL-1 β (b) è stata osservata nell'essudato pleurale raccolto da topi WT. L'assenza del recettore funzionale PPAR- α in topi PPAR- α KO ha determinato un significativo incremento della produzione di TNF- α (a) and IL-1 β (b) nell'essudato pleurico. In maniera analoga è stato osservato anche un incremento dei livelli di mRNA codificante per TNF- α (c) and IL-1 β (d) nel tessuto polmonare di topi WT trattati con carragenina. Nel tessuto polmonare di topi PPAR- α KO trattati con carragenina i livelli di mRNA per TNF- α (c) and IL-1 β (d) erano significativamente più elevati se comparati a quelli di topi PPAR- α WT misurati nelle medesime condizioni. I risultati della real-time PCR sono espressi come rapporto fra il numero di copie della citochina target e il numero di copie del gene housekeeping (GAPDH) al fine di normalizzare i dati ottenuti. *, $P < 0.01$, vs sham; o, $P < 0.01$, vs carragenina-WT group.

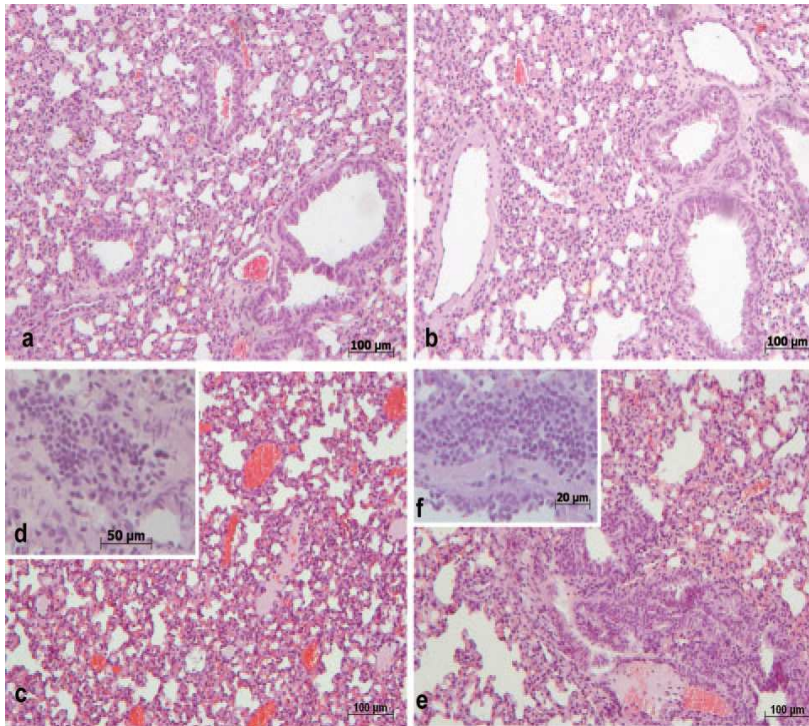


Fig. 5. Effetti del gene PPAR α in danno al polmone. Le biopsie sono state effettuate 4 h dopo la iniezione di carragenina. I tessuti sono stati colorati con ematossilina eosina. Non sono state rilevate alterazioni nel tessuto di topi WT sham di controllo (a) e da topi sham PPAR- α (b). Al contrario sono stati osservati danni nel tessuto polmonare di topi iniettati con carragenina (c) e infiltrazione di cellule infiammatorie (d). L'assenza del gene funzionale PPAR- α in topi PPAR- α KO risulta in un significativo aumento del danno nel tessuto polmonare (e) e al contempo della presenza di numerose cellule infiammatorie (f).

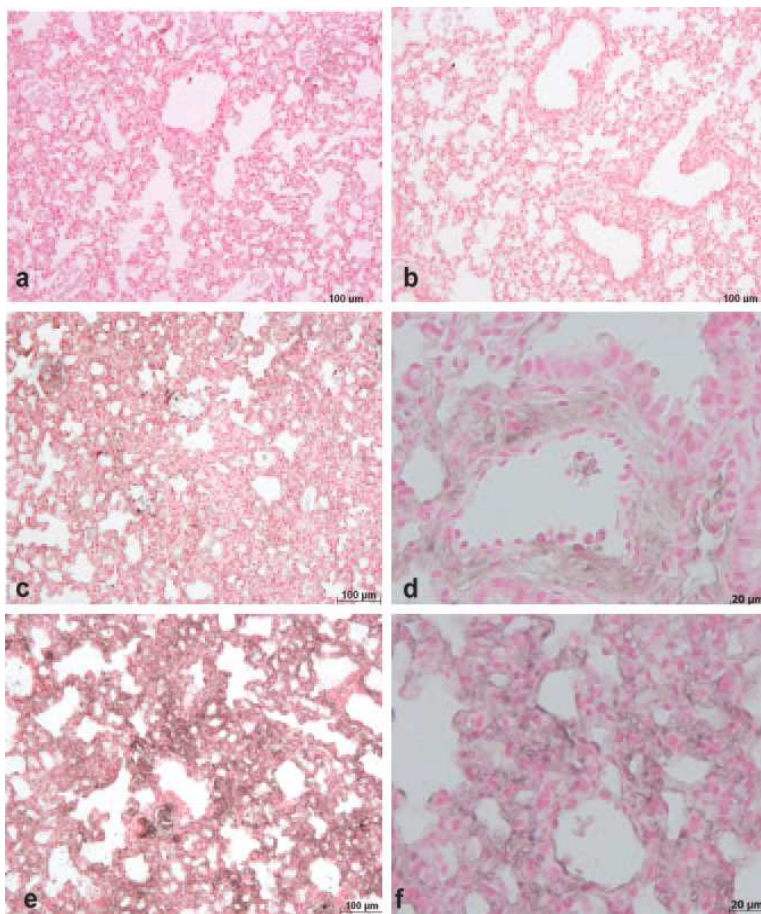


Fig. 7. Localizzazione immunocitochimica di TNF α nel tessuto polmonare. Le sezioni sono state incubate overnight con anticorpo anti- TNF α risospeso in PBS 1:500. Il rilevamento di colore è stato realizzato con DAB (marrone) e fast red nucleare (background rosso).

Non è stata rivelata colorazione positiva per tale citochina in polmoni di nel tessuto di topi WT sham di controllo (a) e da topi sham PPAR- α (b). Al contrario sono state osservate colorazioni positive per danni nel tessuto polmonare di topi iniettati con carragenina (c) e infiltrazione di cellule infiammatorie (d). L'assenza del gene funzionale PPAR- α in topi PPAR- α KO risulta in un significativo aumento del danno nel tessuto polmonare (e) e al contempo della presenza di numerose cellule infiammatorie (f).

Fig. 8. Localizzazione immunoistochimica di IL-1 β nel tessuto polmonare. Le biopsie polmonari sono state prelevate 4 ore dopo l'iniezione di carragenina. Le sezioni sono state incubate *overnight* con anticorpo anti-IL 1 β risospeso in PBS 1:500. Il rilevamento di colore è stato realizzato con DAB (marrone) e fast red nucleare (background rosso). Non sono state rilevate colorazioni positive per IL 1 β nel tessuto polmonare di topi di controllo WT sham (a) e di topi sham PPAR- α (b). La colorazione positiva per IL 1 β (c), prevalentemente localizzata nelle cellule infiammatorie infiltrate, nello spazio vascolare (c) è stata evidenziata in tessuto polmonare di topi WT. L'assenza del gene funzionale PPAR- α nei topi PPAR- α KO ha decretato un significativo aumento della colorazione positiva per IL 1 β (d) nelle cellule infiammatorie infiltrate, nei pneumociti e nello spazio vascolare e nei pneumociti (e).

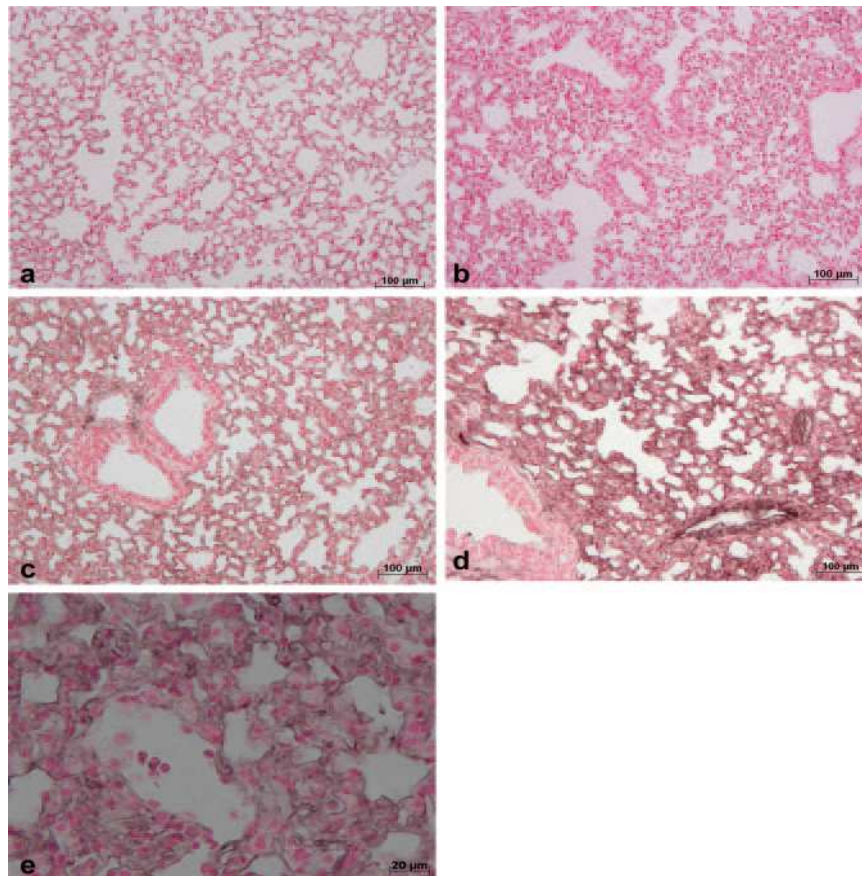


Fig. 9. Localizzazione immunohistochimica di FasL nel polmone. Le biopsie polmonari sono state prelevate 4 ore dopo l'iniezione di carragenina. Le sezioni sono state incubate *overnight* con anticorpo anti-Fas risospeso in PBS 1:500. Il rilevamento di colore è stato realizzato con DAB (marrone) e fast red nucleare (background rosso). Non sono state rilevate colorazioni positive per FasL nel tessuto polmonare di topi di controllo WT sham (a) e di topi sham PPAR- α (b). La colorazione positiva per FasL (c), prevalentemente localizzata nello spazio vascolare (vedi frecce) e nei pneumociti (vedi frecce a punta larga), è stata evidenziata in tessuto polmonare di topi WT. L'assenza del gene funzionale PPAR- α nei topi PPAR- α KO ha decretato un significativo aumento della colorazione positiva per FasL (d) nello spazio vascolare (vedi frecce) e nei pneumociti (vedi

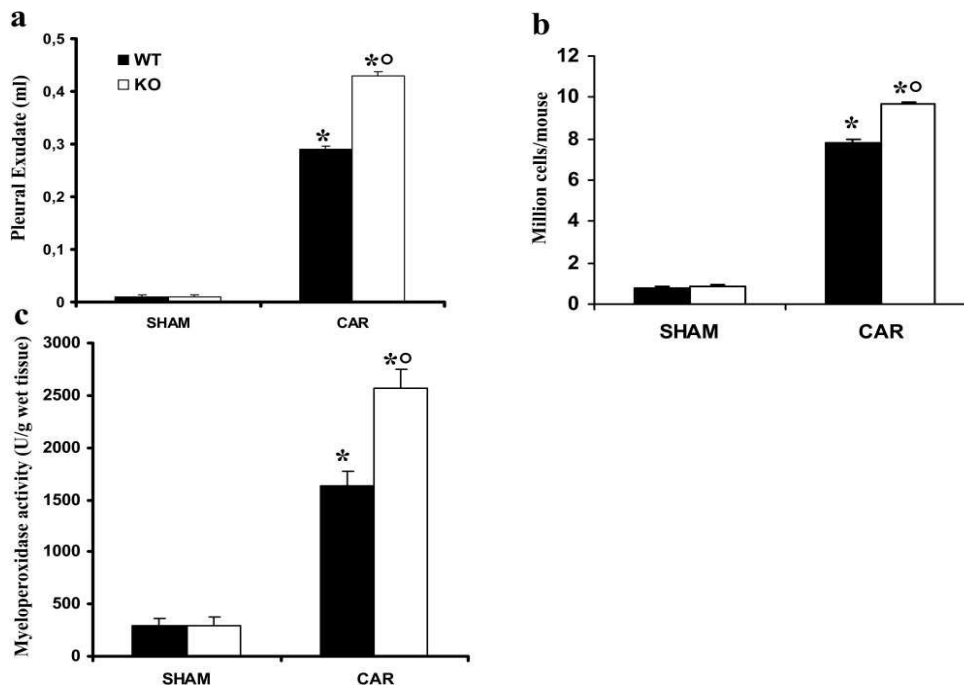
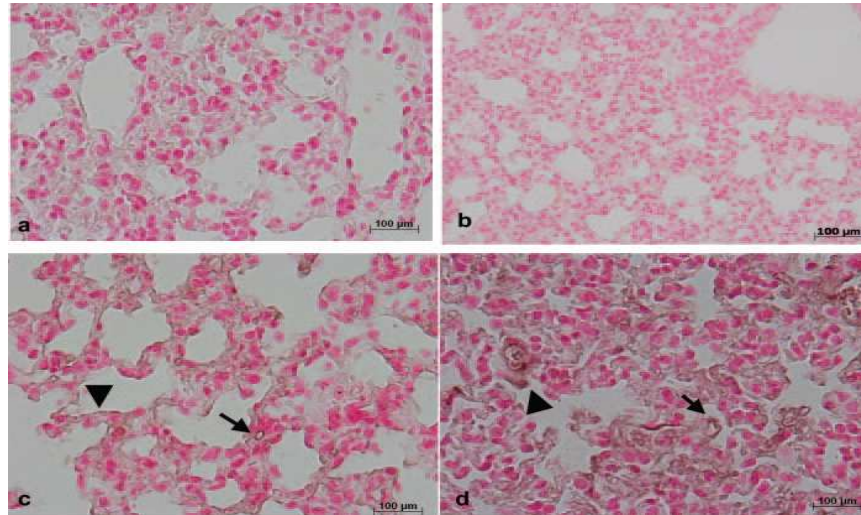


Fig. 4. Effetti del gene funzionale PPAR- α sulla produzione di essudato indotto da carragenina (a), sull'accumulo di polimorfonucleati in cavità pleurica (b) e sull'infiltrazione di neutrofili nel polmone (c). La pleurite è stata indotta mediante somministrazione di 0,2 ml di soluzione salina sterile contenente carragenina all'1% a livello del sesto spazio intercostale. Dopo 4 ore è stato calcolato l'essudato totale prodotto previa sottrazione di quello iniettato. I leucociti presenti nell'essudato sono stati contati con camera di Burker mediante colorazione vitale Tripan Blue.

È stata registrata una rilevante produzione di essudato pleurico (a) e una imponente infiltrazione di polimorfonucleati (b) nella cavità pleurica di topi WT. Inoltre nel tessuto polmonare di topi WT trattati con carragenina si è notato un incremento dell'attività mieloperoxidasica, indicativa dell'infiltrazione dei neutrofili (c). L'assenza del gene funzionale PPAR- α in topi PPAR- α KO determina un notevole incremento dell'essudato pleurico (a) e del numero di cellule infiammatorie in cavità pleurica (b) e nel polmone (c) 4 ore dopo la somministrazione di carragenina. *, $P < 0.01$, versus sham; o, $P < 0.01$, versus gruppo carragenina-WT.

4.1.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Con questo studio si evidenzia come topi con il gene PPAR- α non funzionale presentino una risposta abnormalmente prolungata nei confronti di un processo infiammatorio acuto. In particolare, si è dimostrato come la delezione del gene PPAR- α aumenti lo sviluppo dell'edema degli arti carragenina-indottoe e, in corso di pleurite carragenina-indotta, l'infiltrazione di polimorfonucleati in tessuto polmonare e negli arti, il grado di produzione di citochine proinfiammatorie nel polmone, l'espressione di FasL e il grado di danno tissutale (negli arti e nel polmone) dovuto all'iniezione di carragenina. Tutti questi dati supportano l'idea che il recettore PPAR- α moduli, nel topo, il grado di risposta infiammatoria acuta.

L'espressione di PPAR- α è relativamente elevata in epatociti, cuore, enterociti, muscolo e rene (Clark, 2002). PPAR- α regola l'espressione di geni coinvolti nella β -ossidazione degli acidi grassi, e nel metabolismo delle lipoproteine. Diversi studi, usando topi privi di PPAR- α , hanno dimostrato che questo recettore è coinvolto nel metabolismo delle HDL (high-density lipoprotein), dei trigliceridi e nella regolazione epatica dell'apolipoproteina e della β -ossidazione degli acidi grassi (Peters *et al.*, 1997; Aoyama *et al.*, 1998).

La prima evidenza del ruolo di PPAR- α nel processo infiammatorio si è avuta in studi effettuati su topi PPAR- α KO. In particolare, si è visto che l'infiammazione dell'orecchio indotta da LTB₄ o acido arachidonico, ma non quella da 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate, era prolungata in topi PPAR- α KO, (Devchand *et al.*, 1996). Recentemente, molti ligandi di PPAR- α , compresi il ligando naturale LTB₄ e i ligandi sintetici fenofibrato e Wy14,643, sono stati usati per investigare il ruolo del recettore PPAR- α nell'infiammazione (Clark, 2002).

È stato dimostrato che il palmitoylethanol-amide riduce la risposta infiammatoria usando il recettore nucleare PPAR- α , fornendo quindi la prova che gli acidi grassi naturali funzionano da ligandi endogeni di PPAR- α (Cuzzocrea *et al.*, 2000). In più è stato dimostrato che gli attivatori di PPAR- α inibiscono l'espressione della proteina C-reattiva, indotta da IL1- β , e del fibrinogeno, indotta da IL-6, le maggiori proteine di fase acuta nell'uomo (Kleemann *et al.*, 2003), le cui concentrazioni ematiche sono elevate non solo nell'infiammazione acuta, ma anche in quella cronica. L'azione antinfiammatoria di PPAR- α non è ristretta ai geni che codificano per queste proteine, ma in generale è rivolta ad altri geni coinvolti nella risposta di fase acuta, come quelli che codificano per l'amiloide A e il fibrinogeno a e b (Sharma *et al.*, 2000). L'attivazione di PPAR- α porta alla riduzione della formazione del CCAAT/enhancer-binding protein (c/EBP) β e i complessi p50-NF- κ B e così riduce l'attivazione del promotore del CRP (proteina C reattiva). In più, PPAR- α aumenta l'espressione di I κ B α , prevenendo così la traslocazione nucleare di p50/p65 NF- κ B e arrestando la loro attività trascrizionale nucleare. Il trattamento cronico con fibrati, inoltre, diminuisce il C/EPB β epatico e l'espressione della proteina p50-NF- κ B nei topi in modo PPAR- α dipendente (Gervois *et al.*, 2001). Quest'ultimo effetto sembra contribuire agli effetti antinfiammatori dei fibrati sull'espressione di un'ampia gamma di geni che codificano per le proteine di fase acuta contenenti elementi per questi fattori di trascrizione nei loro promoters.

L'attivazione di NF- κ B è cruciale per l'espressione di FasL indotta da agenti che danneggiano il DNA, come farmaci genotossici e radiazioni UV (Sharma *et al.*, 2000). FasL gioca un ruolo centrale nell'apoptosi indotta da diversi indulti chimici e fisici (Dosreis *et al.*, 2004). Recentemente è stato evidenziato come il segnale Fas-FasL rivesta un ruolo portante nell'infiammazione acuta (ad es. danno polmonare acuto) (Dosreis *et al.*, 2004). In più, la morte cellulare indotta da specie reattive dell'ossigeno (ROS) dipende dall'espressione di FasL mediata dall'attivazione redox-sensitive di NF- κ B (Bauer *et al.*, 1998). La formazione di ROS è stata implicata nell'induzione della morte cellulare e dell'infiammazione di arti e polmoni in seguito alla somministrazione di carragenina (Cuzzocrea *et al.*, 2004; Salvemini *et al.*, 2001) tramite attivazione di NF- κ B e espressione di FasL. In questo studio confermiamo che il

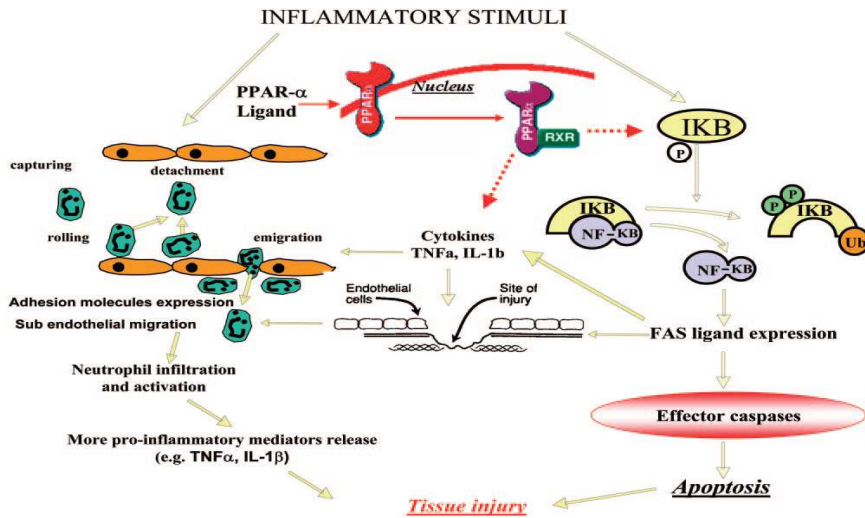
processo infiammatorio (edema degli arti e pleurite carragenina-indotti) porta a una sostanziale attivazione di FasL negli arti e nel tessuto polmonare, che sembra contribuire alle diverse possibili evoluzioni dell'infiammazione acuta.

Nel nostro studio, dimostriamo che l'inibizione dei recettori PPAR- α porta ad un sostanziale aumento dell'attivazione di FasL, con conseguente induzione di una risposta proinfiammatoria caratterizzata dal rilascio di IL-1 β e le chemiochine MIP-1 α (macrophage inflammatory protein), MIP-1 β e MIP-2 (Hohlbaum *et al.*, 2001). C'è evidenza che le citochine proinfiammatorie TNF- α e IL-1 β aiutino la propagazione di un processo infiammatorio locale o sistemico (Yamamoto *et al.*, 1995; Inoue *et Kawanishi*, 1995). Qui confermiamo che il processo infiammatorio (pleurite carragenina-indotta) porta a un sostanziale incremento nei livelli di TNF- α e IL-1 β negli essudati e tessuti polmonari, che sembra contribuire alle diverse possibili evoluzioni dell'infiammazione acuta. È interessante notare come i livelli di queste due citochine proinfiammatorie siano significativamente maggiori in assenza del gene PPAR- α funzionale, suggerendo, quindi, come il recettore PPAR- α moduli l'attivazione e la conseguente espressione di geni proinfiammatori. Comunque, in uno studio *in vivo*, è stato dimostrato che il trattamento di topi CD-1 con fenofibrato o Wy14,643 porta a livelli plasmatici di TNF α 5 volte superiori rispetto a quelli indotti da somministrazione di lipopolisaccaridi, così come a una significativa riduzione della LD50% (50% lethal dose) rispetto ai topi di controllo (Hill *et al.*, 1999). Questi risultati sono anche confermati in topi con PPAR- α deficitario (Hill *et al.*, 1999). Al contrario, negli stessi studi, è stata dimostrata una modesta diminuzione nell'espressione di TNF nei macrofagi peritoneali di topi WT trattati con Wy14,643 (Hill *et al.*, 1999).

Altri studi hanno dimostrato l'importanza di specifiche molecole di adesione nel reclutamento di cellule infiammatorie nell'area di flogosi (Cuzzocrea *et al.*, 2004). L'attivazione e espressione di molecole di adesione permette l'adesione, il cambio conformazionale e la migrazione dei neutrofili, che può determinare danno locale e partecipare all'orchestrazione dell'infiammazione sistemica con tutte le sue conseguenze. Vari studi hanno dimostrato che PPAR- α è espresso in diversi tipi di cellule endoteliali umane (Jackson *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 1999), suggerendo un ruolo per il recettore PPAR- α nella down-regulation delle risposte infiammatorie in questi tipi di cellule. È stato inoltre dimostrato che Wy14,643 riduce in modo significativo l'espressione di VCAM-1 nelle cellule endoteliali umane di aorta, indotta da diversi stimoli *in vitro*. (Jackson *et al.*, 1999).

In modo analogo, in un altro studio, è stato dimostrato che Wy14,643 o il fenofibrato riduce significativamente con modalità tempo- e concentrazione dipendente l'espressione nelle cellule endoteliali di VCAM-1 TNF- α indotta. In accordo con questi dati, abbiamo osservato che l'assenza di un PPAR- α funzionale porta a un significativo incremento dell'infiltrazione neutrofilica, suggerendo come il recettore PPAR- α moduli l'attivazione e la conseguente infiltrazione di neutrofili nei siti di infiammazione.

Ulteriori esperimenti con approcci multipli potrebbero chiarire il potenziale uso a scopi terapeutici della modulazione della via PPAR- α . Noi proponiamo il seguente schema:



L'attivazione del recettore PPAR- α dovrebbe intervenire in questo ciclo, con azione di blocco, prima del danno epiteliale, anche se sono necessari ulteriori studi per confermare questo dato. In conclusione, con questo studio si evidenzia come la via del PPAR- α moduli il grado di infiammazione acuta nei topi riducendo l'attivazione del FasL, la produzione di citochine proinfiammatorie e l'infiltrazione dei neutrofili.

4.2 Sperimentazione 2

Effetti del 17 β -estradiolo nella trasduzione del segnale e nel danno secondario in lesione al midollo spinale sperimentalmente indotta

4.2.1 INTRODUZIONE

Il danno al midollo vertebrale è una patologia altamente debilitante (Maegele *et al.*, 2005).

Sebbene siano in fase sperimentale l'uso di medicinali innovativi finalizzati al miglioramento del paziente con trauma al midollo spinale (*spinal cord injury (SCI)*), i miglioramenti in farmacoterapia finalizzati al limitare il danno neuronale e promuovere la rigenerazione del tessuto nervoso rimangono ancora molto limitati.

La complessa patofisiologia alla base di SCI potrebbe spiegare la difficoltà nel trovare una terapia valida. Un danno traumatico meccanico primario a carico del midollo spinale determina la morte di un determinato numero di neuroni che non possono essere risanati o rigenerati.

Vari studi indicano come i neuroni continuino a morire per ore successivamente all'evento traumatico conseguente a SCI (Balentine, 1985).

Gli eventi che caratterizzano questa seconda fase successiva al danno meccanico sono definiti "danno secondario"; tale danno secondario è frutto di una serie di eventi a livello cellulare, molecolare e biochimico. Un gran numero di recenti studi mostra come una risposta infiammatoria di tipo locale sia responsabile in gran parte di tale danno secondario (Blight, 1992).

Le caratteristiche tipiche di flogosi derivante da SCI in modelli animali ampiamente caratterizzate sono le seguenti: infiltrazione di cellule infiammatorie (neutrofili polimorfonucleari, macrofagi e linfociti), rilascio di mediatori infiammatori, attivazione di cellule endoteliali che determina un aumento della permeabilità vascolare, la formazione di edema e la distruzione tissutale (Popovic *et al.*, 1996).

Poichè vi è un coinvolgimento di una così complessa patofisiologia in corso di SCI, la terapia da attuarsi deve coinvolgere più molecole in grado di agire su più fronti. Uno studio precedente ha suggerito di come il trattamento con l'ormone di natura steroidea 17 β -estradiolo (E2) possa attenuare il danno determinato in corso di SCI (Szabò *et al.*, 1998); 17 β -estradiolo, la forma di estrogeno maggiormente presente nell'organismo, è stato dimostrato possedere effetto neuroprotettivo e avere effetti terapeutici in vari modelli di patologia al sistema nervoso centrale dove erano predominanti processi di infiammazione e fenomeni immunomediati (Sibnick *et al.*, 2003; 2005).

17 β -estradiolo esercita i suoi effetti neuroprotettivi in parte agendo come molecola antiinfiammatoria ma anche quale antiossidante (Vegeto *et al.*, 2004); il preciso meccanismo attraverso il quale gli E2 agiscono quali agenti antinfiammatori non è ancora stato completamente compreso.

Scopo del presente studio è stato quello di indagare gli effetti degli estrogeni nel modulare i danni secondari conseguenti a lesione del midollo spinale.

Per caratterizzare gli effetti esercitati da 17 β -estradiolo in un modello sperimentale di SCI, siamo andati a valutare l'espressione di citochine proinfiammatorie confrontando tale dato con altri parametri coinvolti nella risposta infiammatoria quali danno istologico, il ristabilirsi dell'attività motoria, infiltrazione dei neutrofili, l'espressione di nitrotirosina, iNOS e COX 2, l'apoptosi e l'espressione di Bax e Bcl-2.

In aggiunta siamo andati a valutare l'effetto esercitato dalla somministrazione di un antagonista per il recettore degli estrogeni (ICI 182,780) sui medesimi parametri.

4.2.2 MATERIALI E METODI

Animali

Topi maschi adulti CD1 (25 ± 5 gr; Harlan Nossan, Milano, Italia) sono stati stabulati in ambiente controllato e alimentati con acqua e pellet per roditori. Il benessere animale è stato rispettato seguendo le normative italiane vigenti (D.M. 116/92) e comunitarie (O. J. of E.C.L 358/1 12/18/1986) per quanto concerne gli animali da sperimentazione.

Lesioni al midollo spinale

I topi sono stati anestetizzati con cloralio idrato (400 mg/KG di peso) (Genovese *et al.*, 2006). Dopo incisione longitudinale sulla linea mediana del dorso, si è proceduto con esposizione dei muscoli paravertebrali. L'ablazione di tali muscoli ha permesso l'esposizione delle vertebre nel tratto T5-T8. È stato quindi esposto il midollo spinale mediante laminectomia in T6 e T7, andando a determinare la lesione al midollo spinale esercitando una compressione extradurale di 24 g mediante clip per aneurisma applicandole per circa 1 minuto. Dopo l'intervento chirurgico è stata somministrata per via sottocutanea 1 ml di soluzione salina in modo da reintegrare il volume di sangue perso in seguito al trattamento chirurgico.

Durante l'operazione e subito dopo i topi sono stati posizionati su superficie riscaldata e coperti con un panno caldo. Gli animali sono stati messi in gabbia singolarmente in stanza a temperatura costante di 27°C e la sopravvivenza è stata calcolata in un arco di tempo di 10 giorni. Cibo e acqua erano forniti ad libitum. In questo periodo è stato effettuato uno svuotamento manuale della vescica 2 volte al giorno fino al momento della ripresa delle normali funzioni organiche. Nei controlli negativi, i topi sono stati sottoposti esclusivamente a laminectomia.

Gruppi sperimentali

I topi sono stati casualmente assegnati ad uno dei seguenti gruppi:

- **gruppo salina + SCI** in cui i topi hanno subito SCI e ai quali è stata somministrata soluzione salina per via sottocutanea ($n = 40$);
- **gruppo E2** stesso trattamento del gruppo salina + SCI ma in aggiunta somministrazione di 17 β -estradiolo per via sottocutanea alla dose di 300 μ g/Kg 1 ora prima di SCI, e 3 e 6 ore dopo SCI. ($n = 40$);
- **gruppo ICI**: stesso trattamento del gruppo E2 ma hanno anche ricevuto ICI 182,780 (500 μ g/Kg) somministrato 1 ora prima l'iniezione di E2 ($n = 40$);
- **gruppo salina + sham**: in cui i topi sono stati sottoposti alle manualità chirurgiche viste in precedenza ma ai quali non sono state applicate le clip responsabili di SCI (controllo negativo ($n = 40$);
- **gruppo sham + E2**: stesso trattamento del gruppo salina + sham ma riceventi somministrazione di E2 ($n = 40$);
- **gruppo sham + ICI**: stesso trattamento del gruppo sham + E2 ma questo gruppo riceve inoltre somministrazione di ICI 182,780 (500 μ g/Kg) somministrato 1 ora prima l'iniezione di E2 ($n = 40$).
-

Negli esperimenti riguardanti il punteggio motorio (*motor score*), gli animali di tutti i gruppi sperimentali sono stati mantenuti sotto osservazione giornaliera per i 9 giorni successivi a SCI. A diversi tempi (**Figura 1**) 10 soggetti appartenenti ad ogni gruppo sono stati sacrificati per analizzare i vari parametri elencati. Tale protocollo sperimentale è stato ponderato sulla

base di altri esperimenti condotti in parallelo per quanto concerne tempi e dosi di somministrazione dell'estrogeno in accordo con altri studi già pubblicati (Yune *et al.*, 2004) mentre dosi e tempi di somministrazione di ICI 182,780 sono stati tratti dalla letteratura (Cuzzocrea *et al.*, 2000).

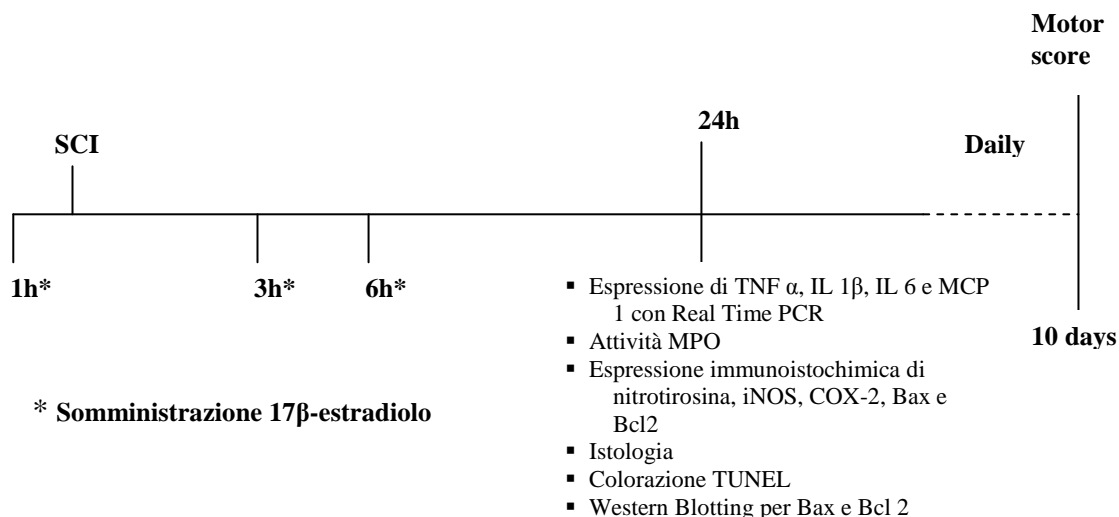


Figura 3. I topi sono stati sacrificati a diversi tempi sperimentali in modo da valutare i diversi parametri in esame (n=10 topi per ogni gruppo per ogni tempo sperimentale). 17 β -estradiolo è stato somministrato per via sottocutanea alla dose di 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 1 ora prima di SCI, 3 e 6 ore dopo SCI. ICI 182,780 (500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) è stato somministrato 1 ora prima la somministrazione di E2.

Real Time PCR

Un segmento di midollo spinale (320 ± 124 mg) comprendente il punto di lesione è stato omogenizzato in una soluzione di Tri reagent in accordo con le istruzioni fornite dal produttore (Sigma, Deisenhofen, Germany). L'RNA totale cellulare è stato isolato dalla fase acquosa procedendo alla quantificazione dell'RNA messaggero codificante per interleuchina 1 beta (IL 1 β), interleuchina 6 (IL 6), Tumor Necrosis Factor alfa (TNF α) e proteina ad azione chemiotattica per i monociti (MCP 1) mediante PCR real time di tipo quantitativo.

La quantità di ogni citochina è stata normalizzata attraverso il rapporto con il gene housekeeping gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GADPH).

L'RNA estratto da ogni singolo midollo spinale è stato retrotrascritto in cDNA complementare a singolo filamento mediante Random Hexamers con l'uso di trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi aviaria (Takara, Japan) in 20 μl di reazione dopo trattamento con DNasi e stoccaggio in freezer a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La coppia di primer per ogni citochina è stata disegnata mediante software Oligo (Molecular Biology Insights, Cascade, Colorado) (Tabella 1). La reazione di amplificazione ha seguito i seguenti parametri: uno *step* di denaturazione per 15 minuti a 95°C seguito da 40 cicli di denaturazione (94°C per 30 sec), 30 sec di annealing (IL 6 a 54°C , MCP 1 a 54°C , TNF α a 61°C , IL 1 β a 61°C , GADPH a 56°C), 15 sec a 72°C seguiti da una estensione finale di 7 minuti a 72°C . I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro mediante elettroforesi.

Gli amplificati purificati sono stati clonati all'interno di un vettore plasmidico, trasformati in E coli TOP 10 (Invitrogen) e purificati con Turbo kit (QBIogene, Irvine, California). Il plasmide ricombinante è stato linearizzato mediante taglio di sequenza target con l'enzima di restrizione *PmeI* (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Almeno 6 diluizioni in base 10 di tale

plasmide tagliato sono state utilizzate come campioni a concentrazione nota in corso di ogni singola Real Time.

Tutte le reazioni di Real Time PCR sono state messe a punto con il rotore Rotor-Gene 3000 System (Corbett Research, Australia). Le amplificazioni sono avvenute in un volume totale di 25 μ l contenente i reagenti come descritto di seguito; 1X di SYBR PREMIX Ex Taq Takara, 200 nM per ogni primer forward e reverse, 1X di Rox Reference Dye e 2 μ l di cDNA come raccomandato dal protocollo del produttore. I parametri di ogni ciclo sono stati i seguenti: 10 min a 95°C per l'attivazione della polimerasi seguiti da 40 cicli di 15 sec a 95°C, 15 sec di annealing (differenti a seconda della coppia di primers considerati), 20 sec a 72°C.

Il segnale di emissione della fluorescenza è stato rilevato sul canale FAM (multichannel machine) (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) con una fluorescenza rilevata a partire dal termine dello step a 72°C di ogni ciclo.

È stata tracciata una curva di melting dopo l'amplificazione mantenendo la temperatura a 72°C per 12 s seguiti da gradualmente aumenti di 0,1°C/s fino a raggiungere i 95°C, con l'acquisizione della fluorescenza in ogni step sul FAM channel (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5).

Il test della temperatura di melting del prodotto di reazione può ovviare al problema della fluorescenza data dai prodotti di reazione aspecifici.

Tabella 1 Coppie di primer utilizzati in corso di amplificazione e lunghezza dell'amplificato (bp)

Citochina considerata	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
GADPH	aacatcatccctgcatcca	cagatccacgacggacaca	123
IL 6	tgagatctactcggcaaac	ttgttctctacgaagaact	125
TNF α	catcttctcaaaattcgagtgacaa	gggttgctacctgtctactccca	175
IL 1 β	caaccaacaagtgatattctccatg	gatccacactctccagctgca	152
MCP 1	tgtcaccaagctcaagaga	cagatttacgggtcaactt	173

Nel corso della medesima sperimentazione sono stati valutati altri parametri coinvolti nell'infiammazione mediante altre tecniche di laboratorio o evidenziazioni cliniche quali:

- l'estrazione della componente proteica e successivo Western Blotting per valutare l'espressione di Bax e Bcl-2;
- valutazione del danno tissutale a livello istopatologico attribuendo un diverso punteggio a seconda del numero di neuroni eosinofili presenti mediante una scala di riferimento;
- valutazione del danno neurologico a livello clinico;
- valutazione immunohistochimica per nitrotirosina, iNOS, mieloperossidasi, COX-2, Bax e Bcl2;
- dosaggio di TUNEL;
- attività della mieloperossidasi (MPO);

4.2.3 RISULTATI

Per determinare la capacità del 17 β -estradiolo nel modulare la risposta infiammatoria mediante regolazione della secrezione di citochine, siamo andati a valutare a livello tissutale la presenza di RNA messaggero codificante per alcuni di tali mediatori solubili coinvolti nella flogosi di fase acuta quali IL 6, MCP 1, TNF α e IL 1 β .

Si è potuto notare un aumento significativo dei livelli di IL 6, MCP 1, TNF α e IL 1 β nel midollo spinale di topi sottoposti a SCI 24 ore dopo l'avvenuta lesione.

Nel tessuto midollare spinale di topi a cui era stato somministrato 17 β -estradiolo i livelli di mRNA per tutte le citochine considerate si sono mostrati decisamente inferiori rispetto al gruppo SCI sottoposto alle stesse condizioni.

La somministrazione sincrona di ICI 182,780 con 17 β -estradiolo ha registrato un significativo blocco degli effetti esercitati da 17 β -estradiolo su IL 6, MCP 1, TNF α e IL 1 β , anche se è da sottolineare come tale antagonista a livello recettoriale sia in grado di bloccare solo in parte l'effetto terapeutico esercitato da E2 sulla produzione di citochine e chemochine (**Fig 1**).

I risultati della PCR di tipo qualitativo sono stati espressi come rapporto fra numero di copie del gene target e numero di copie del gene housekeeping GAPDH in modo da ottenere una normalizzazione del dato assoluto.

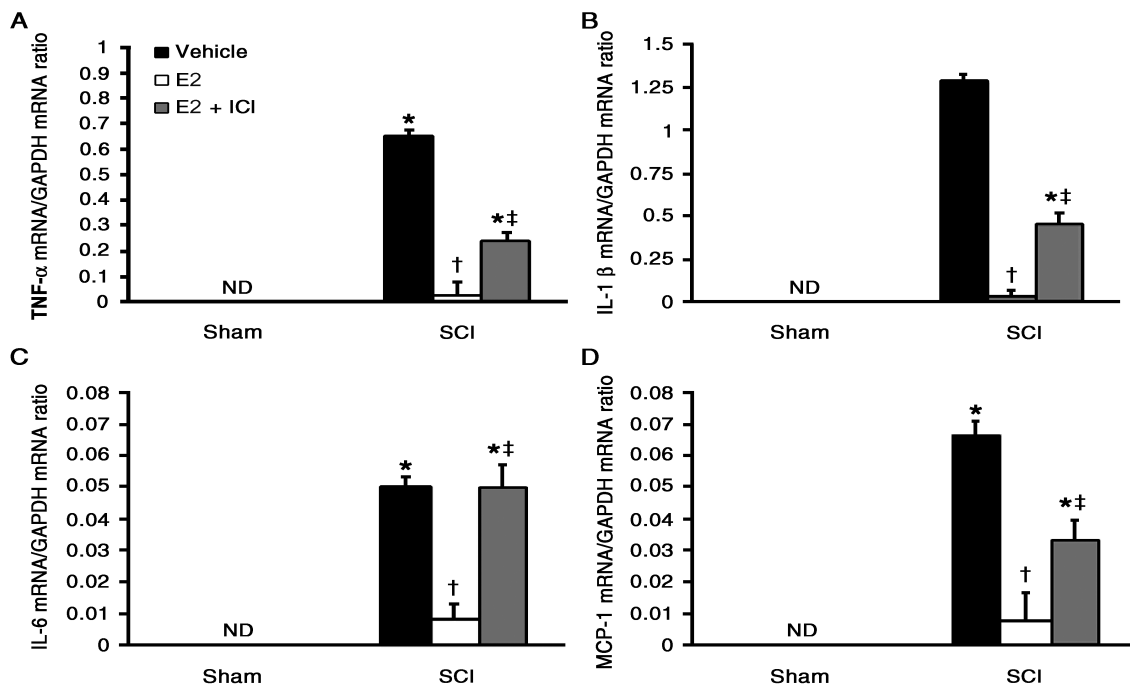


Fig 1 . Effetti di E2 sui livelli di TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1 rilevati nel tessuto di midollo spinale di topi. Un aumento significativo dei livelli di RNA messaggero codificante per TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), e MCP-1 (D), è stato osservato in tessuto di midollo spinale di topi 24 h dopo SCI. Il midollo spinale di topi SCI trattati con E2 ha mostrato un notevole decremento nel livello di TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), e MCP-1 (D) comparati agli animali sottoposti alla sola SCI. La somministrazione contemporanea dell'antagonista ICI 182,780 e degli E2 ha bloccato gran parte dell'effetto esercitato da E2 sull'espressione di TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), e MCP-1 (D).

I risultati della real-time PCR sono espressi come rapporto fra il numero di copie della citochina target e il numero di copie del gene housekeeping (GAPDH) al fine di normalizzare i dati ottenuti.

* $P < 0,05$ vs veicolo; † $P < 0,01$ vs SCI; ‡ $P < 0,02$ vs E2

Tale risultato rilevato dalle nostre indagini è stato confermato dalla valutazione degli altri parametri indagati nel corso della sperimentazione.

A livello istopatologico la severità del danno rilevato attraverso la colorazione con ematossilina eosina ha mostrato come topi sottoposti a lesioni al midollo siano caratterizzati da demielinizzazione soprattutto a carico del funicolo dorsale e laterale (**Fig 2**). La somministrazione di E2 attenuava invece la degradazione mielinica mentre la contemporanea somministrazione dell'antagonista per gli estrogeni ICI 182,780 bloccava tale effetto.

L'infiltrazione neutrofilica valutata attraverso l'attività mieloperossidasi (MPO) mostrava un notevole incremento in tessuto di soggetti sottoposti a SCI comparati a soggetti in cui veniva somministrato 17 β estradiolo e, anche per quanto riguarda tale parametro, si assisteva d un blocco di tale attività in conseguenza alla somministrazione dell'antagonista recettoriale.

La colorazione immunoistochimica per iNOS e per la formazione di nitrotirosina metteva in luce come vi fosse una colorazione positiva soprattutto in cellule infiammatorie e cellule di Schwann nella materia bianca e grigia di topi sottoposti a SCI. Il trattamento dei topi con E2 riduceva l'intensità della colorazione per iNOS e nitrotirosina. La contemporanea somministrazione di ICI 182,780 andava a bloccare tale evidenza.

La somministrazione di E2 ha mostrato anche essere in grado di ridurre il grado di colorazione positiva per COX 2 con particolare localizzazione a cellule di Schwann e cellule infiammatorie (**Fig 3**).

I parametri indagati per valutare il grado di apoptosi nel tessuto ha mostrato come sia con colorazione TUNEL e sia andando a valutare l'espressione di Bax e Bcl-2 con Western Blotting l'apoptosi sia notevolmente ridotta in topi ai quali era stato somministrato 17 β estradiolo se comparato ai topi sottoposti alla sola SCI. L'apoptosi veniva incrementata dalla somministrazione dell'antagonista per gli estrogeni.

Da un punto di vista clinico, la somministrazione di estrogeni seguente a SCI determinava un miglioramento dello score di deambulazione mentre i danni neurologici a livello di arti posteriori si perpetravano in topi ai quali veniva somministrato l'antagonista ICI 182,780.

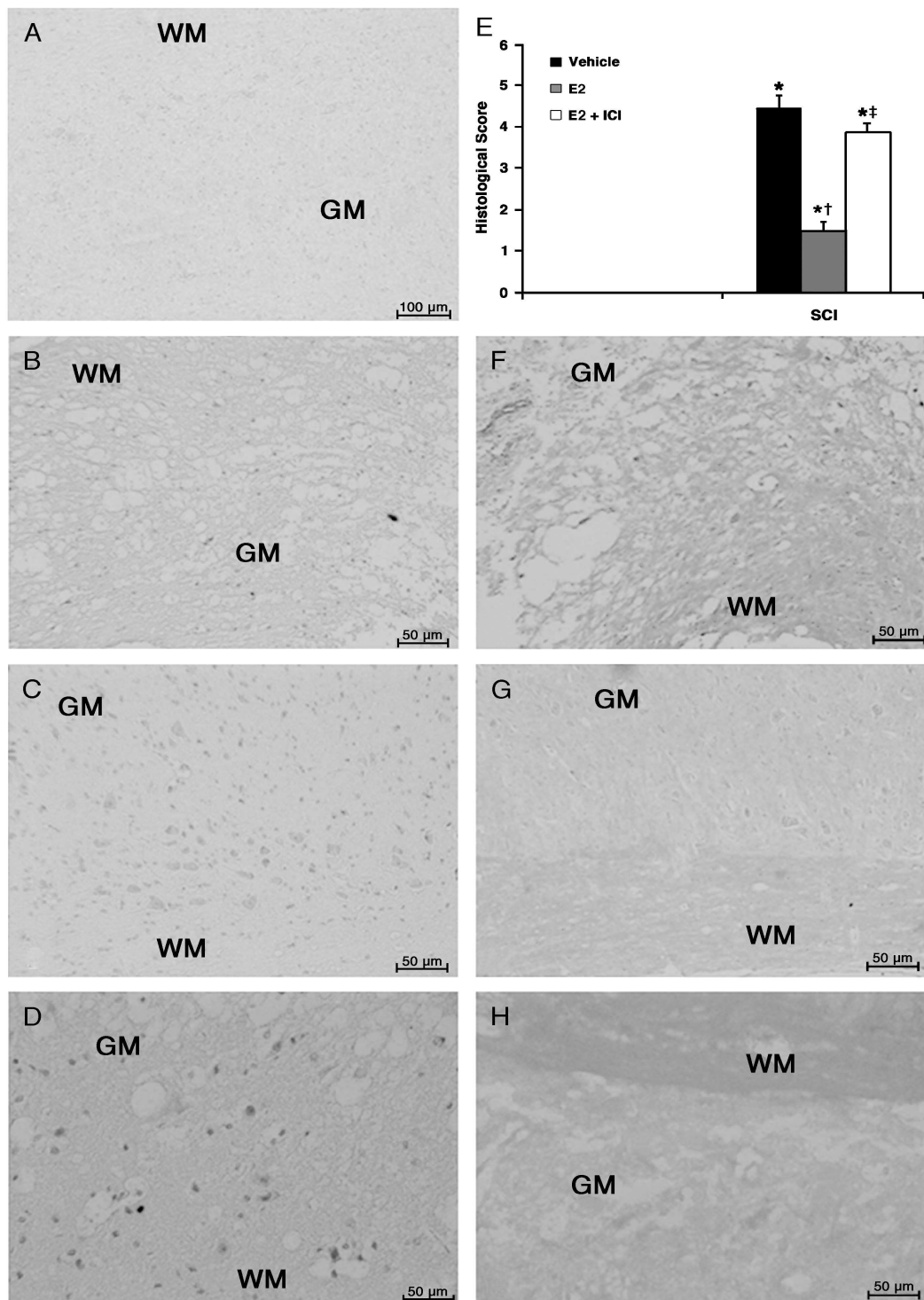


Figura 2. Effetti della somministrazione di E2 sulle alterazioni istologiche di midollo spinale 24 h dopo le lesioni. Non sono rilevabili alterazioni a carico del gruppo di controllo negativo (salina + sham) (A). Un danno significativo è rilevato in topi sottoposti a SCI e non trattati con E2 con edema tissutale e alterazioni della materia bianca (B). Una significativa protezione dal danno indotto da SCI è stata osservata nel tessuto spinale di topi trattati con E2 dopo SCI. (C). La struttura mielinica è stata valutata con *Luxol fast blue staining*. Dopo 24 h da SCI si nota una significativa perdita di mielina in topi SCI non trattati (F), mentre, in topi SCI trattati con E2 si assiste ad una attenuazione della degradazione mielinica (G). La coamministrazione di ICI 182,780 e E2 blocca in maniera significativa gli effetti salutari esercitati da E2 per quanto concerne le alterazioni istologiche (D) e sulla componente mielinica (H). Il punteggio istologico è stato attribuito da un osservatore esterno (E).. *P G 0.01 vs. SHAM; †P G 0.01 vs. SCI; ‡P G 0.01 vs. E2. **GM** materia grigia; **WM**, materia bianca .

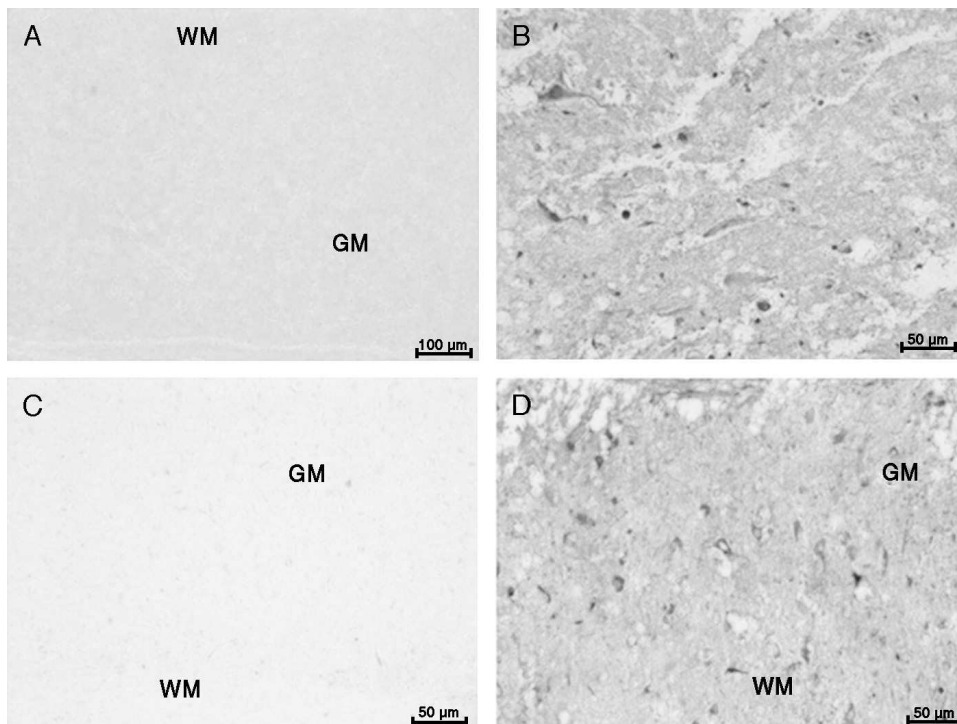


Fig 3 Colorazione immunohistochimica per la localizzazione di COX 2. Non è stata rilevata colorazione per tessuto raccolto da topi sham operated. La somministrazione di E2 in topi SCI determina una notevole riduzione nella colorazione di COX-2 (C) nel tessuto di midollo spinale comparato alla colorazione per COX-2 (B) rilevata in midollo spinale proveniente da topi sottoposti esclusivamente a SCI. La somministrazione contemporanea di ICI 182,780 e E2 blocca drasticamente gli effetti di E2 su COX-2 (D). **GM** materia grigia; **WM**, materia bianca .

4.2.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il 17 β -estradiolo ha dimostrato avere un effetto terapeutico in corso di una moltitudine di modelli di patologie a livello neurologico, incluso SCI (Sribnick *et al.*, 2005).

I nostri risultati mostrano come E2 eserciti degli effetti benefici in modelli di SCI di modelli murini dato dal fatto che 17 β -estradiolo riduce l'espressione di citochine e chemochine proinfiammatorie oltre a diminuire una serie di altri parametri di flogosi quali il grado di danno a livello istologico del midollo spinale, l'infiltrazione di neutrofili, l'espressione di iNOS, nitrotirosina e COX-2 e l'apoptosi.

I nostri risultati utilizzando i dati forniti dall'esame di tipo istologico indicano che l'edema determinato da SCI era ridotta dal pretrattamento con E2. L'applicazione di clip vascolari alla dura madre del tratto sottoposto a laminectomia nel tratto T5-T8 ha determinato edema e demielinizzazione a carico del corno dorsale e laterale, e questo danno a livello istologico era associato ad una perdita delle funzione motoria.

In tale situazione il pretrattamento con E2 ha ridotto in maniera significativa il danno istologico e conseguentemente la perdita di funzione motoria.

Molti studi hanno dimostrato come la risposta infiammatoria caratterizzata da infiltrazione di neutrofili e attivazione della microglia si sviluppi poche ore dopo SCI (McTigue *et al.*, 2000).

In questo studio è stato confermato come vi sia un'infiltrazione di neutrofili 24 ore dopo SCI. Inoltre si è visto come la somministrazione di E2 riduca la presenza di tale tipologia cellulare nel tessuto sottoposto a danno. Il reclutamento di cellule infiammatorie quali i neutrofili è responsabile nella produzione di numerosi fattori immunomodulatori, inclusi citochine e mediatori lipidici.

Tra le citochine, TNF α e IL 1 β sono mediatori proinfiammatori responsabili del reclutamento e attivazione leucocitaria (Maier *et al.*, 2006). Inoltre, ci sono molti dati che vanno ad avvalorare l'ipotesi che tali mediatori siano coinvolti nella patogenesi di SCI (Genovese *et al.*, 2005).

Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione di citochine proinfiammatorie, TNF α e IL 1 β comprese, sono espresse in sede di lesione conseguente a SCI. In questo studio abbiamo confermato un incremento significativo nell'espressione di RNA messaggero per IL 6, MCP 1, TNF α e IL 1 β nel midollo spinale 24 ore dopo SCI., mentre la somministrazione di E2 riduceva l'espressione di queste citochine.

Gli studi indicano anche le citochine giocano un importante ruolo nell'induzione di iNOS, fattore riconosciuto essere coinvolto nei processi patologici di SCI (Matsuyama *et al.*, 1998). I nostri risultati indicano che il trattamento con E2 riduce l'espressione di iNOS in topi sottoposti a SCI e la nostra ipotesi è che il decremento dell'attività iNOS mediata sia imputabile ad una riduzione dell'espressione endogena di TNF α e IL 1 β . Nei processi patologici di SCI di tipo acuto è stato postulato anche un coinvolgimento di una up regulation dell'attività di COX 2. E' ormai risaputo che COX 1 e COX 2 sono espressi nel tessuto midollare spinale, sia per quanto concerne il trascritto sia il trasdotto, e che la proteina COX 2 è espressa negli astrociti della materia bianca anche in condizioni fisiologiche. Inoltre anche l'espressione di COX 2 è mediata da TNF α e IL 1 β (Tonai *et al.*, 1999; Vanega *et al.*, 2001). I nostri risultati dimostrano che nel midollo spinale di topi sottoposti a somministrazione di E2 dopo SCI, vi è una minor colorazione per COX 2 confrontati al quadro proposto dal tessuto di topi sottoposti alla sola SCI. Tali risultati sono in accordo con altre osservazioni che rivelano una relazione fra produzione di TNF α ed espressione di COX 2. In aggiunta, molti lavori hanno evidenziato un aumento di molecole ossigeno-reattive in corso di danno secondario conseguente a SCI (Xu *et al.*, 2001).

Per confermare il coinvolgimento di perossinitriti al danno secondario da SCI, abbiamo la formazione di nitrotirosina nel tessuto danneggiato. I nostri risultati indicano che la colorazione immunoistochimica per nitrotirosina era ridotta in tessuti di topi trattati con 17 β -estradiolo.

La formazione di nitrotirosina era stata inizialmente proposta come un marker specifico quale prodotto conseguente alla formazione endogena di perossi-nitriti (Beckman, 1996).

C'è comunque un recente lavoro che dimostra come la produzione di nitrotirosina possa essere conseguenza anche di altre reazioni quali quella innescata fra nitriti e acido cloridrico e fra mieloperossidasi e H₂O₂ (Endoh *et al.*, 1994).

Un aumento della colorazione per nitrosina quindi è da considerarsi quale indice di un aumentato stress da nitrati piuttosto che uno specifico indice per la generazione di perossinitriti. Sperimentazioni effettuate di recente hanno dimostrato l'induzione di apoptosi in diverse linee cellulari in risposta all'azione di perossinitriti, NO e reattivi dell'ossigeno (Merrill *et al.*, 1993)

Usando la metodica Western Blotting e la colorazione di TUNEL, abbiamo confermato come E2 determini un'attenuazione dell'apoptosi durante SCI. E' noto infatti che Bax è una molecola chiave in coro di apoptosi (Chittenden *et al.*, 1995) in corso di lesioni al sistema nervoso centrale. E' stato inoltre dimostrato che la somministrazione della proteina di fusione Bcl-xL in midollo spinale danneggiato aumenta in maniera considerevole la sopravvivenza dei neuroni, suggerendo come tale proteina sia coinvolta nell'apoptosi neuronale (Nesic-Taylor *et al.*, 2005). Basandosi su tali presupposti, siamo andati a rilevare dei cambiamenti a livello trascrizionale, inclusa una *up regulation* di proteina Bax ad effetto pro apoptotico e una *down regulation* della anti apoptotica Bcl-2. L'attività antiossidativa esercitata da E2 potrebbe in parte giustificare alcuni elementi riscontrati in corso di tale sperimentazione.

Comunque l'attività antiossidante di E2 è osservata a concentrazioni farmacologiche di ormone e non è bloccata dall'azione di antagonisti recettoriali per gli estrogeni.

Nel nostro lavoro viene proposto non tanto il minor danno determinato da lesione al midollo spinale (SCI) se si ricorre a pretrattamento con E2, quanto piuttosto l'effetto antagonizzante

verso questo esercitato da ICI 182,780, antagonista recettoriale per gli estrogeni. Tali risultati permettono di affermare che l'effetto esercitato da E2 è recettore-mediato. Questi risultati presi nel loro complesso non fanno che confermare il ruolo svolto da E2 nella patogenesi del danno a livello di midollo spinale conseguente a trauma. Rimane comunque da stabilire se la somministrazione di E2 anche se in grado di bloccare la cascata di eventi determinante effetti deleteri su questo tipo di lesioni, non abbia effetti controproducenti sulla risposta infiammatoria dell'ospite.

4.3 Sperimentazione 3

Valutazione dell'attività immunomodulatoria esercitata da componenti del colostro bovino mediante uso di modelli transgenici

4.3.1 INTRODUZIONE

La composizione del colostro è sostanzialmente diversa da quella del latte non solo dal punto di vista nutrizionale ma anche da quello immunologico essendo provvisto oltre che di componenti necessarie per il fabbisogno e lo sviluppo del vitello, anche di vari elementi immunoregolatori (Kelly, 2003) in grado di conferire al neonato una immunità di tipo passivo sia mediante il trasferimento di immunoglobuline sia attraverso una vasta serie di altre sostanze quali citochine, lattoferrina (Caccavo *et al.*, 2002), lisozima, lattoperossidasi e polipeptidi ricchi in prolina (Gill *et al.*, 2000; Pakkanen *et al.*, 1997).

Recenti studi (Davies *et al.*, 2005) hanno mostrato le capacità del colostro di agire quale immunoregolatore con effetti terapeutici in corso di infezioni intestinali, di patologie di tipo autoimmune e di disordini gastro-intestinali indotti da antinfiammatori non steroidei (Thapa, 2005). Il potenziale impiego del colostro come immunoregolatore si riveste quindi di interesse sia nel limitare le reazioni di tipo autoimmune sia nell'indurre un potenziamento della risposta immunitaria verso determinate *noxae* (Cross *et al.*, 2000; Brix *et al.*, 2005; Togawa *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2005). La valutazione dell'effetto immunomodulatore di tali componenti colostrali è pertanto di estrema importanza sia per la ricerca di nuove molecole ad azione immunitaria sia per la miglior comprensione dei meccanismi immunologici.

Obiettivo di questo studio è stata la valutazione dell'effetto immunomodulatore esercitato da 11 componenti del colostro bovino. A tal fine, in una prima fase, sono stati impiegati due modelli sperimentali, uno costituito da linfociti ottenuti da animali l'altro costituito da linfociti ibridoma derivati. Sul primo è stata determinata la capacità dei prodotti colostrali di indurre la proliferazione cellulare, sul secondo la produzione di IL2. In una seconda fase, è stato valutato l'effetto esercitato da alcuni prodotti colostro-derivati sul fenotipo delle cellule presentanti l'antigene (APC) ed a tal fine sono state valutate le variazioni di alcuni marker di superficie (CD 40, CD 80, CD 86 e MHC II) coinvolti nella produzione citochinica. Infine è stata quantificata la produzione di diverse citochine presenti nel surnatante delle cellule T poste in coltura con diverse concentrazioni di prodotti colostro derivati.

4.3.2 MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Entrambi i modelli sperimentali impiegati in questo studio per la misurazione dell'effetto immunomodulatore esercitato dalle componenti colostrali erano costituiti da linfociti T di tipo DO11.10, transgenici per il recettore dell'ovalbumina (OVA). In un modello i linfociti sono stati ottenuti mediante splenectomia da topi DO11.10 mentre nell'altro si sono utilizzati linfociti DO11.10 ibridoma-derivati.

In primo luogo, per entrambi i modelli, è stata determinata la concentrazione sub ottimale di ovoalbumina previa processazione di quest'antigene da parte di cellule maturate di midollo osseo (BMDC) in seguito a stimolazione in vitro con GM-CSF. Per le cellule T DO11.10 derivate dagli splenociti è stata effettuata una curva di titolazione del livello di proliferazione

linfocitaria (CPM) determinata da differenti concentrazioni di albumina *in toto* (OVA) con addizione o meno in cultura di lipopolisaccaridi (LPS).

Una medesima curva di titolazione è stata tracciata per quanto concerne la produzione d'interleuchina 2 (IL 2) da parte di linfociti T DO11.10 ibridoma-derivati stimolati con diverse concentrazioni di OVA peptide (OVA₃₂₃₋₃₃₉). Ciò perché, avendo tale linea cellulare capacità mitogena propria, non assumeva alcun significato valutare l'effetto mitogeno esercitato dall'aggiunta dell'antigene.

In un secondo tempo è stato considerato l'effetto esercitato su ciascun sistema dall'aggiunta di concentrazioni decrescenti di prodotto colostrale bovino.

La relazione fra IL 2 e proliferazione linfocitaria è ben definita (Benczik e Gaffen, 2004); si è valutato pertanto se questi due parametri fossero concordi e mantenessero una correlazione nel definire gli effetti immunomodulatori esercitati dai prodotti colostrali bovini. Tutti i valori di IL 2 e proliferazione linfocitaria (CPM) sono stati normalizzati mettendoli in rapporto con il controllo costituito da cellule sottoposte esclusivamente all'antigene OVA, proteina o peptide, in assenza di prodotti colostro derivati.

Successivamente alcuni prodotti con elevata correlazione fra IL 2 e proliferazione linfocitaria sono stati selezionati per esaminare l'effetto esercitato dagli stessi sull'espressione fenotipica delle cellule presentanti l'antigene (APC: *antigen presenting cells*) ottenute da midollo osseo (*Bone marrow dendritic cells - BMDC*) per evidenziare se la stimolazione linfocitaria e la produzione di IL2 fossero determinate da sovra o sotto regolazione di alcuni *cluster* di differenziazione (CD). In particolare si sono stati valutati *cluster* coinvolti nella produzione citochinica quali CD40, CD80, CD86 e complesso maggiore di istocompatibilità di classe 2 (MHC II).

In ultima analisi, sempre con l'obiettivo di comprendere maggiormente l'effetto esercitato dal singolo composto su alcuni parametri della risposta immunitaria, nel surnatante delle culture cellulari si è provveduto alla misurazione di alcune citochine coinvolte nella modulazione linfocitaria cellulo mediata o umorale (IL 2, IL4, IL 5, IL 10, IFN γ).

Topi transgenici e linee cellulari ibridoma derivate DO11.10

Le linee di topi transgenici e le linee cellulari ibridoma derivate DO11.10 (Murphy *et al.*, 1990) impiegate nello studio hanno un caratteristico recettore (*T cell receptor, TCR*) in grado di riconoscere la sequenza aminoacidica di proteina dell'OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Robertson *et al.*, 2000) presentato in compresenza ad un MHC II (I-A^d) e trovano applicazione come modello di studio in corso di diverse indagini sperimentali. Le cellule ibridoma derivate DO11.10 sono linee a replicazione continua *in vitro* mentre i linfociti T derivanti dai topi DO11.10 sono stati ottenuti mediante filtrazione dell'omogenizzato splenico su *nylon wool column*.

Cellule dendritiche derivanti da midollo osseo

Le cellule derivanti dal midollo osseo (*Bone marrow dendritic cells - BMDC*) sono state prelevate in maniera sterile dal femore di topi Balb/C. Dopo aver lisato i globuli rossi con cloruro d'ammonio, le BMDC sono state seminate in piastra da 6 pozzetti risospingendole ad una concentrazione di 1×10^6 cellule in terreno cDMEM addizionato al 5% di siero fetale bovino e 20 ng/ml di GM CSF ricombinante di natura murina; al 6° giorno sono state raccolte le cellule non adese.

Le BMDC sono state quindi seminate in piastra da 96 pozzetti ad una concentrazione 5×10^5 cellule per ml e stimolate con diverse concentrazioni di albumina dell'uovo sotto forma di peptide (OVA₃₂₃₋₃₃₉) o di intera proteina (OVA) (Sigma). Si è inoltre valutato l'effetto esercitato dall'aggiunta di lipolisaccaridi (LPS) sull'espressione di complessi maggiori di istocompatibilità.

Sottoprodotti del colostro bovino

Gli 11 sottoprodotti di colostro bovino che sono stati esaminati nel presente lavoro sono stati forniti dalla ditta LactoPharma® Fonterra (Nuova Zelanda) che, per ragioni commerciali, ha richiesto di non rivelarne la composizione. I prodotti sono pertanto identificati con la dicitura MP (*Milk Product*) seguita da un numero: MP 1084, MP 1086, MP 55, MP 1042, MP 517, MP 964, MP 1077, MP 1078, MP291, MP 887.

Proliferazione linfocitaria

Per la valutazione della proliferazione linfocitaria sono stati impiegati 2×10^6 linfociti T per pozzetto ai quali, nel terreno di coltura, sono stati aggiunti 50 μCi /pozzetto di timidina triziata. Dopo 18 ore di incubazione si è proceduto alla raccolta delle cellule su carta Filtermat attraverso Harvester 96 Mach 3 (Tomtec, Orange, CT, USA) e le radiazioni emesse sono state contate mediante scintillatore MicroBeta. I risultati sono stati espressi come conteggio per minuto (CPM). Ogni risultato è l'espressione di una media fra 3 determinazioni.

Quantificazione di IL 2

Per la quantificazione di interleuchina 2 (IL 2) è stata allestita una sandwich ELISA attraverso l'impiego di piastre ricoperte da anticorpo purificato anti IL 2 murina diluita in PBS ad una concentrazione finale di 1-4 $\mu\text{g/ml}$. Lavata la piastra con soluzione di Tween 20 0,05% in PBS, si sono bloccati gli anticorpi non *coattati* con albumina sierica bovina (BSA) 1%. Aggiunti in ogni pozzetto 100 μl di surnatante da testare e gli standard diluiti, si è proceduto con aggiunta di anticorpo anti IL 2 purificato biotinato (BD Pharmingen, CA). Infine, aggiunta la streptavidina mediante substrato TMB, si è bloccata la reazione con acido solforico. La piastra è stata letta ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Ogni risultato è l'espressione di una media fra 3 determinazioni.

Analisi di markers fenotipici in BMDC

La determinazione dell'espressione dei *markers* di superficie è stata effettuata mediante citometria di flusso.

Dopo 48 ore di incubazione con diverse concentrazioni di prodotti colostrali, le BMDC sono state raccolte, lavate con soluzione salina fosfata Dulbecco (D-PBS) e sospese in una concentrazione finale di 1×10^6 cellule con 1 μg di anticorpi FITC-labeled rat anti-mouse CD86, PE-labeled hamster anti-mouse CD40, PE-labeled hamster anti-mouse CD80, APC-labeled hamster anti-mouse CD11c, FITC-labeled rat anti-mouse CD86, PE-labeled rat anti-mouse I-A/I-E (MHC classe II) anticorpi (tutti gli anticorpi sono stati acquistati da BD Pharmingen, CA).

Un appropriato anticorpo di controllo isotipico è stato utilizzato per ogni marker di superficie considerato per determinare il livello di colorazione di background.

L'analisi della fluorescenza è stata rilevata tramite *FACScalibur flow cytometer* (Becton–Dickinson Immunocytometry Systems, CA). L'istogramma e il dot-plot dei dati raccolti sono stati elaborati con software CellQuest V3.1 (Becton–Dickinson Immunocytometry Systems, CA).

Sono state considerate esclusivamente le cellule positive per CD 11c, marker indicante una maturità delle cellule presentanti l'antigene, e dalle caratteristiche di forma e dimensione tali da soddisfare i criteri di selezione per le APC. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule positive all'interno di tale sottopopolazione. I dati sono stati elaborati con il software *Cell Quest V3.1 program*.

Quantificazione citochinica

Il surnatante prelevato dalle colture cellulari di diversi prodotti del colostro, considerati a diverse concentrazioni, è stato sottoposto a metodica di valutazione citochinica tramite Bioplex

(Bio-Rad). Il principio di tale dosaggio prevede un anticorpo specifico coniugato a biglie in grado di emettere fluorescenza a diverse lunghezze d'onda. Sfruttando tale differenziazione, il *detector* è in grado di quantificare nello stesso campione di partenza molteplici citochine. Nel nostro caso è stato preso in considerazione il profilo T_{H1}/T_{H2} valutando le seguenti citochine: interleuchina 2 (IL 2), interleuchina 4 (IL 4), interleuchina 5 (IL 5), interleuchina 10 (IL 10), interferone gamma (IFN γ).

Analisi statistica

Il confronto del grado di proliferazione linfocitaria e della produzione di IL 2 di popolazioni linfocitarie rispettivamente sottoposte a diverse concentrazioni di antigene OVA proteina e OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide è stato fatto mediante analisi della varianza ad una via seguito da test di Bonferroni per dati non associati.

Il confronto tra il grado di proliferazione linfocitaria e la produzione di IL 2 ottenute, per ciascun MP, nei due modelli sperimentali è stato fatto mediante regressione lineare.

L'analisi statistica è stata effettuata con software GraphPad 4.0 ed il livello di significatività è stato posto a $p < 0,05$.

4.3.3 RISULTATI

La titolazione della proliferazione dei linfociti T derivanti da splenociti di topi DO11.10 (**Fig. 1**) ottenuta con l'aggiunta dell'antigene proteina OVA *in toto*, ha mostrato, un andamento definito da buona attendibilità, confermata dalla bassa deviazione standard e dalla differenza statisticamente significativa ($p < 0,001$) rilevata fra tutte le diverse concentrazioni di OVA considerate.

L'aggiunta di LPS alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in coltura con l'obiettivo di incrementare l'espressione di MHC II non ha determinato differenze se non per piccole concentrazioni di OVA proteina (10, 5 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{pozzetto}$) peraltro senza significatività statistica ($p > 0,05$).

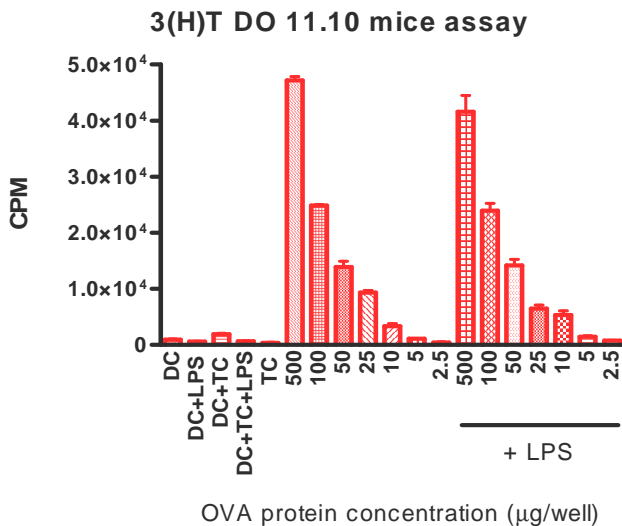


Figura 4. Titolazione della proliferazione di linfociti T derivanti da splenociti di topi DO11.10 sottoposti a diverse concentrazioni di antigene OVA proteina. Abbreviazioni: **DC**: cellule dendritiche; **TC** linfociti T DO11.10; **LPS** lipopolisaccaridi.

La titolazione dell'IL 2 prodotta dalle cellule T DO11.10 ibridoma derivate sottoposte a diverse concentrazioni di peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Fig. 2) si è rivelata proporzionale alla quantità di antigene addizionato in cultura e riconosciuta dal recettore TCR. Anche in tale modello l'attendibilità della titolazione è stata avvalorata da una bassa deviazione standard e da una differenza statisticamente significativa ($p < 0,001$) fra le diverse concentrazioni di antigene aggiunte alla coltura. Tali valori concordano con quanto già rilevato in letteratura da Ozaky et al. (2004).

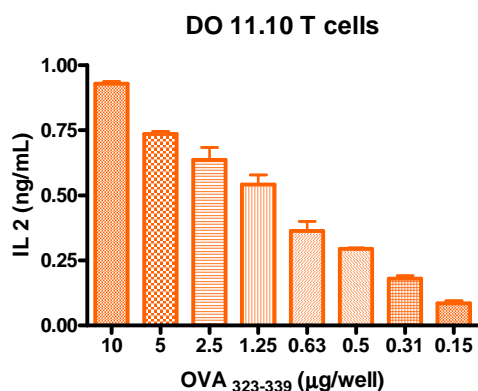


Figura 5 Titolazione della produzione di IL 2 in linfociti T DO11.10 ibridoma derivati sottoposti a differenti concentrazioni di OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide.

Definita la concentrazione sub ottimale per le due metodiche (100 µg/pozzetto OVA proteina e 3,3 µg/pozzetto per OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide) si è proceduto all'aggiunta della sostanza colostro-derivata in analisi valutando l'effetto esercitato da questa sulla produzione di IL 2 e sulla proliferazione linfocitaria nella coltura *in vitro*.

I risultati ottenuti con le due metodiche condotte in parallelo sono stati confrontati fra di loro mediante regressione lineare con l'obiettivo di verificare se esistesse una correlazione fra le due metodologie d'analisi.

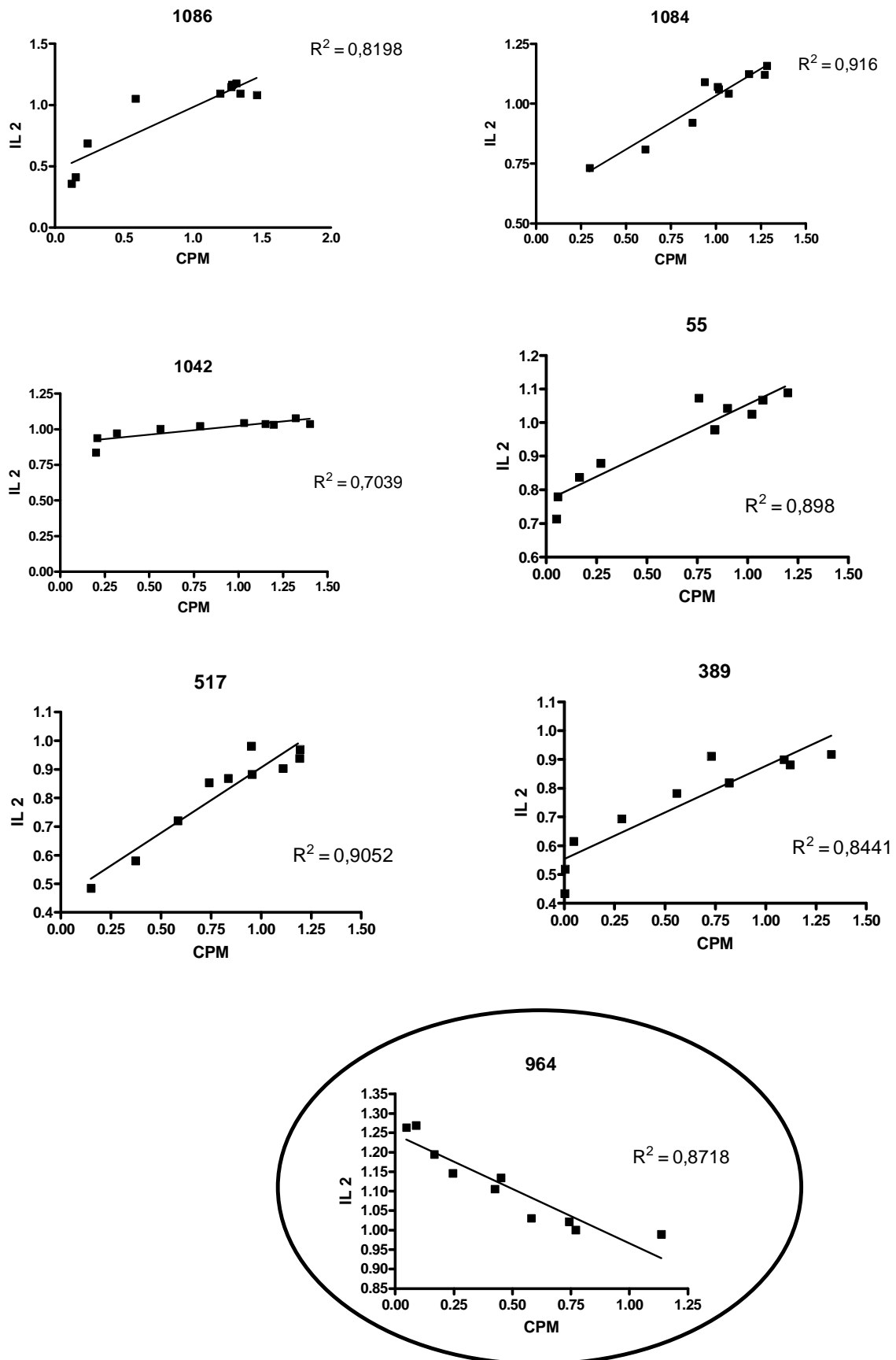


Figura 3. Regressione lineare tra IL 2 e indice di proliferazione linfocitaria T (CPM) per alcuni prodotti del latte considerati. I valori sono stati normalizzati con il controllo di linfociti T stimolati esclusivamente con OVA₃₂₃₋₃₃₉ od OVA intera, espresso dal valore 1. Abbreviazioni: CPM = conteggio per minuto, IL = interleuchina.

Dal confronto è emerso che, per 7 MP su 11, la sintesi di IL 2 da parte delle cellule T DO11.10 ibridoma derivate si correla in maniera significativa con l'indice di proliferazione linfocitaria con valori di R^2 compresi fra 0,7039 per il MP 1042 e 0,916 per il MP 1084 (**fig. 3**).

Per gli altri 4 MP testati (MP 1077, MP 1078, MP291, MP 887) invece, l'analisi statistica ha mostrato una correlazione non significativa, tale da far ipotizzare l'intervento di altri criteri di valutazione nel coinvolgimento della risposta immunitaria (dati non mostrati).

Particolarmente interessante appare il comportamento del MP 964 (**Fig. 3 cerchiata**) che mostra una correlazione negativa fra i due parametri IL 2/CPM, a sottintendere un aumento di produzione di citochina parallelamente alla diminuzione della proliferazione linfocitaria, rilievo alquanto anomalo visto il coinvolgimento di tale proteina nel fenomeno di proliferazione linfocitaria stessa.

La valutazione dell'effetto esercitato a diverse concentrazioni dai prodotti del colostro sul fenotipo delle Antigen Presenting Cells (APC), ossia delle BMDC una volta maturate, effettuato per 4 MP con correlazione positiva (MP 1042, MP 1084, MP 1086 e MP 964), è stata fatta misurando l'espressione di marker di superficie di interesse immunitario coinvolti nella produzione citochinica (CD 40, CD 80, CD 86), e del complesso maggiore di istocompatibilità di classe 2 (MHC II) (**Fig. 4**). Le variazioni osservate in questi marker fenotipici, pur non elevate in termini assoluti, rivelano comunque la capacità da parte di certi sottoprodotti del latte nel modulare la risposta immunitaria verso una stimolazione o una soppressione. In particolare il prodotto MP 1042 ha determinato, anche a basse concentrazioni, un notevole incremento nell'espressione di CD80 e CD86, entrambe molecole coinvolte nella stimolazione linfocitaria permettendo l'attivazione e la sopravvivenza dei linfociti T (Lanier *et al.*, 1995).

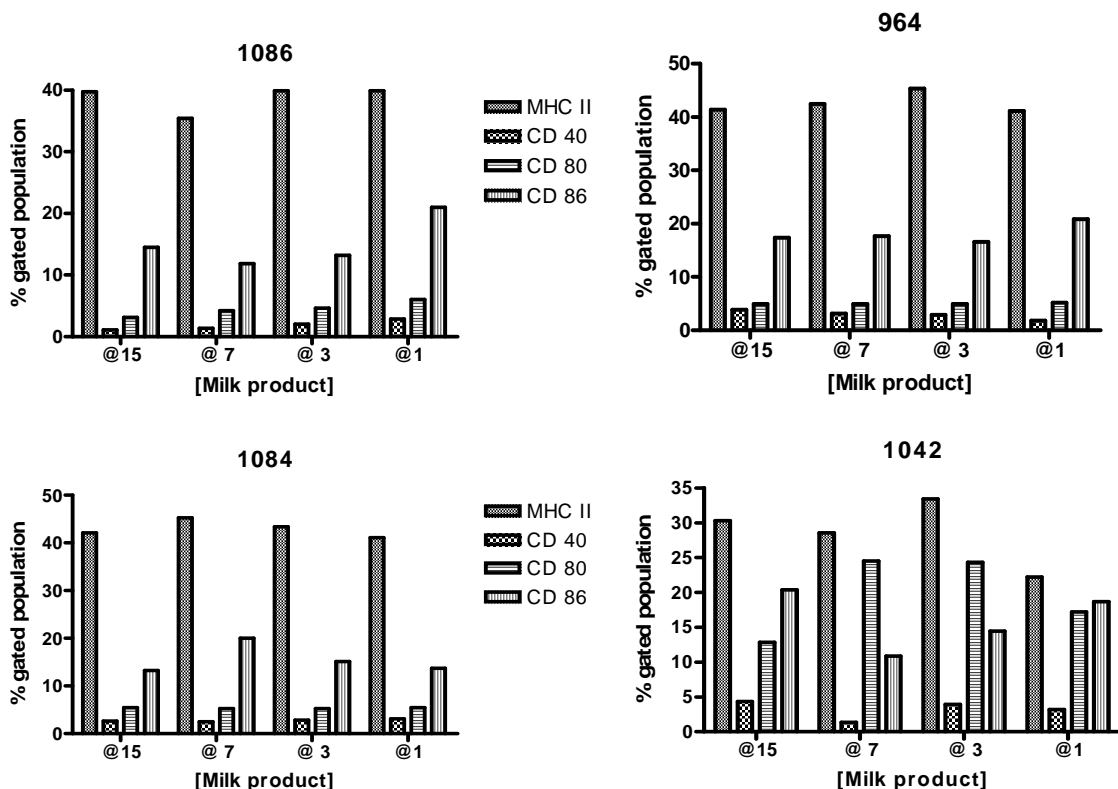


Figura 4. Valutazione dell'espressione fenotipica di cellule presentanti l'antigene sottoposti a diverse concentrazioni del prodotto colostrale. Abbreviazioni **CD** cluster di differenziazione; **MHC II** complesso maggiore di istocompatibilità, @ concentrazione MP ($\mu\text{g}/\text{pozzetto}$)

La successiva determinazione delle citochine coinvolte in risposte di tipo Th1 (IFN gamma e IL 2) o Th2 (IL 4, IL 5 e IL 10) nel surnatante delle colture di linfociti T derivanti dagli splenociti

di topi DO11.10, ha consentito di osservare delle variazioni suggestive di una polarizzazione di una risposta immunitaria di tipo anticorpale (Th2) piuttosto che cellulo-mediata (Th1), come chiaramente mostrato dal confronto delle stimolazioni ottenute con i MP rispetto al controllo positivo costituito dall'aggiunta della sola proteina OVA (**fig. 5**).

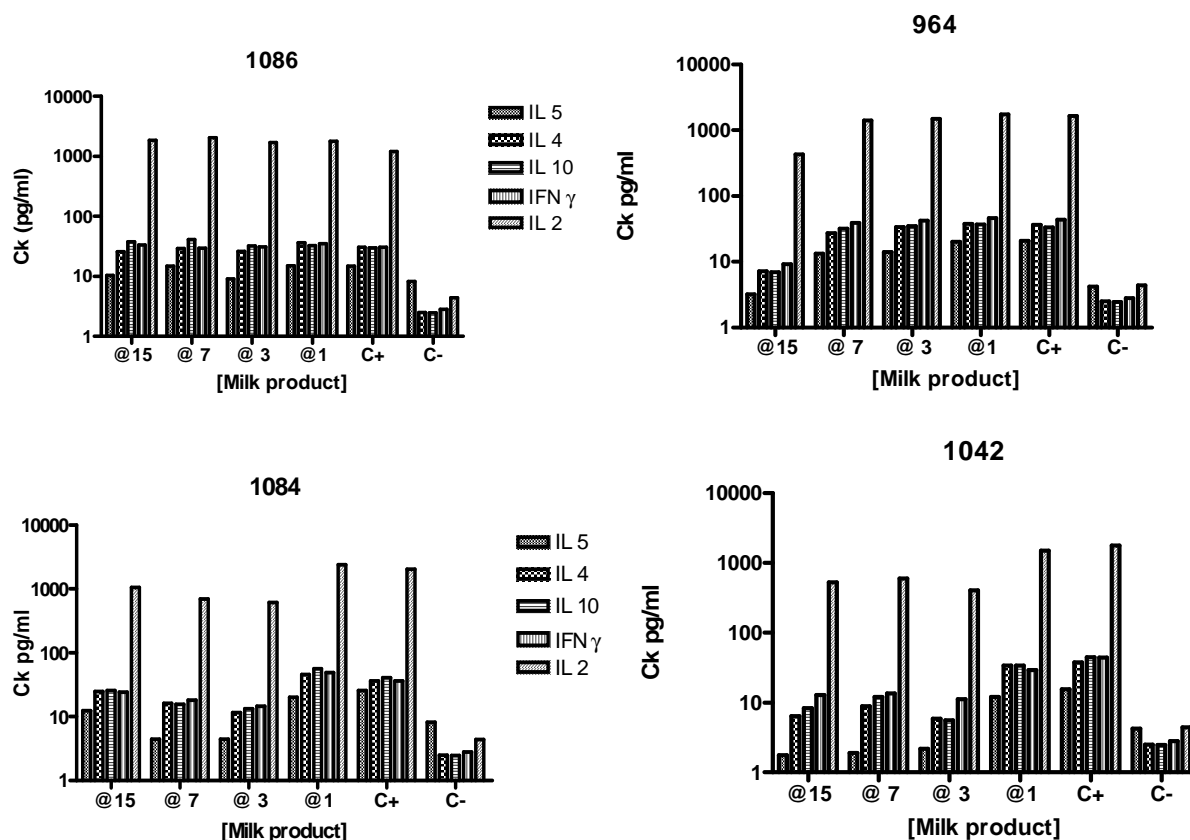


Figura 5. Quantificazione citochinica in surnatante di linfociti T derivanti da splenociti di topi DO11.10. Abbreviazioni **IL** interleuchina; **IFN** interferone; @ concentrazione $\mu\text{g}/\text{pozzetto}$ I risultati sull'asse y sono espressi mediante scala logaritmica.

4.3.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio mettono in evidenza in primo luogo l'effetto immunomodulatore esercitato da diverse componenti del colostro. Infatti le modificazioni osservate nella produzione di IL 2, nella proliferazione linfocitaria, nella fenotipizzazione delle cellule presentante l'antigene (APC) e, infine, nella produzione citochinica, concorrono a dimostrare *in vitro* una attività immunitaria del colostro che va ben al di là del semplice trasferimento di immunoglobuline al neonato. In prospettiva, questa capacità dei componenti del colostro di modificare il comportamento di elementi cellulari del sistema immunitario fa pensare ad una loro applicazione in campo nutraceutico quali alimenti funzionali nella terapia di malattie immunomediate nelle quali sia preponderante una risposta anticorpale mediata da linfociti Th2 piuttosto che, in altri casi, in patologie nella quale si voglia stimolare una risposta di tipo Th1 cellulo-mediata.

In secondo luogo è da mettere in evidenza come ambedue le metodiche utilizzate (sia la titolazione dell'IL 2 prodotta dalle cellule T DO11.10 ibridoma derivate sia la titolazione della proliferazione dei linfociti T derivanti da splenociti di topi DO11.10), abbiano consentito di evidenziare gli effetti immunomodulatori esercitati dalle componenti del colostro bovino, come

dimostrato dalla buona correlazione riscontrata tra i risultati ottenuti con le due metodiche per 7 degli 11 MP testati.

Questo dato lascia ipotizzare che l'impiego della metodica con linee cellulari possa rappresentare un'alternativa a quella che prevede l'uso di animali come donatori di linfociti per ricerche di questo tipo.

4.4 Sperimentazione 4

Studio preliminare sulla risposta immunitaria innata indotta da *Staphylococcus aureus*

4.4.1 INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus risulta essere tutt'oggi l'agente patogeno che maggiormente colpisce la mammella del bovino e che quindi è frequentemente causa di mastite. Il potere patogeno di tale microrganismo è dovuto alla capacità di produrre una enorme varietà di sostanze extracellulari, tra le quali le più importanti sono le *enterotossine*, proteine semplici resistenti all'azione di numerosi enzimi, che svolgono il ruolo di "superantigeni" attraverso la stimolazione della proliferazione non specifica dei linfociti T, interferendo così con l'immunità dell'ospite.

L'immunità innata è un campo estremamente vasto per la ricerca e, malgrado decenni di studio, le attuali conoscenze nei confronti delle difese innate della mammella verso *S. aureus* risultano incomplete. D'altra parte, questa scarsa conoscenza rappresenta un problema per il controllo dell'infezione, in quanto in alcune aziende le vacche risultano positive già al primo parto e successivamente sono refrattarie alla terapia.

In questa sperimentazione abbiamo voluto studiare l'interazione fra 16 diversi ceppi di *S. aureus* provenienti da sette aziende diverse, tutti produttori di 2 o più enterotossine, e i linfociti isolati dal sangue di vacche provenienti da una stalla dove tale patogeno è assente. La scelta di utilizzare ceppi di campo si basa sulla loro diversa patogenicità e sulla differente evoluzione della mastite osservata; per quanto riguarda i linfociti, l'utilizzo di un pool di cellule provenienti da vacche in buono stato di salute, tutte intorno ai 100-120 giorni di lattazione, ha reso possibile l'eliminazione della variabilità dovuta al singolo animale.

Le citochine di nostro interesse sono state l'interferone gamma (INF- γ) per una parziale valutazione dell'immunità innata, e l'interleuchina-8 (IL-8) per la sua attività chemiotattica nei confronti della popolazione neutrofilica.

Il "sistema interferone" è costituito da varie proteine classificabili in tre gruppi principali denominati α , β e γ .

L' INF- γ è la principale citochina coinvolta nell'attivazione dei macrofagi e svolge molte funzioni cruciali sia nell'immunità innata che nel tipo di immunità acquisita di tipo cellulo mediata. E' una proteina monometrica prodotta da cellule linfocitarie Natural Killer (NK), CD4⁺ T_H1, CD8⁺. Le cellule NK secernono INF- γ in risposta al riconoscimento di strutture microbiche non self o in seguito a stimolazione da parte dell'IL-12. In tale sistema l'INF- γ agisce come mediatore del sistema immunitario di tipo innato. Nell'immunità di tipo adattativi invece le cellule T producono INF- γ in risposta al riconoscimento dell'antigene espresso sulle *Antigen Presenting Cells* (APCs) e la sua produzione è catalizzata dalla presenza di IL-12 e IL-18. Come funzioni biologiche riveste l'importantissimo ruolo di attivare una risposta cellulo mediata contro gli agenti microbici di tipo intracellulare.

Attiva infatti i macrofagi mediando l'azione di linfociti NK e linfociti T e permettendo ai primi di eliminare gli agenti fagocitati. Ciò avviene mediante la stimolazione nella sintesi di prodotti reattivi intermedi dell'ossigeno e ossido nitrico e attivando l'espressione dei geni codificanti per tali componenti. Queste molecole reattive sono prodotte all'interno di lisosomi che unendosi alla componente fagocitata (fagolisosomi) determinano la distruzione

dei microbi. L' IFN- γ stimola l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e II (MHC I ed MHC II) e funge da costimolatore per le APCs; IFN- γ promuove la differenziazione di linfociti T naive CD4⁺ verso la sottopopolazione cellulare T_H1 e inibendo nel contempo la proliferazione della sottopopolazione cellulare di tipo T_H2; agisce sulle cellule B promuovendo lo switching verso l'isotipo anticorpale IgG2a e inibendo contemporaneamente l'asse di produzione di IgG1 e IgE mediata dall'IL-4. Questo a riprova di come IFN- γ e IL-4 si rendano responsabili di 2 risposte antitetiche in ambito immunitario; il primo infatti decretando maggiormente una risposta cellulo mediata reclutando e stimolando la sottopopolazione linfocitaria T_H1, la seconda coinvolta in una risposta di tipo anticorpale mediata dai linfociti T_H2 e dalle linfociti B (Billiau, 1996).

Appartiene alle chemochine, una grande famiglia di molecole strutturalmente simili alle citochine in grado di stimolare e regolare la movimentazione leucocitaria dal sangue ai tessuti. In particolare IL-8 appartiene alle CXC, che sta ad indicare come i 2 residui cisteinici terminali nell'estremità N siano separati da un aminoacido. Questo attribuisce in corso di flogosi la capacità a tale chemochina di esercitare la propria azione prevalentemente sui neutrofili a differenza delle CC che hanno un ruolo preponderante nel reclutamento di eosinofili. Tali proteine infatti hanno funzioni prevalentemente sul reclutamento linfocitario in corso di flogosi ma rivestono anche ruoli fisiologici. IL-8 ha un peso molecolare che si aggira sui 10-Kd e la sua struttura contiene 2 loops con ponti disolfuro al suo interno. La sua secrezione è conseguenza di stimolazione microbica o indotta da altre citochine di fase acuta quali Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) e interleuchina 1 (IL-1). IL-8 ha inoltre un ruolo nel regolare il traffico di cellule immunitarie verso organi linfoidi periferici in particolare promuovendo la migrazione di cellule T, cellule B e cellule dendritiche anche verso tessuti non linfoidi quali organi mucosali e cute (Lahouassa *et al.*, 2007).

4.4.2 MATERIALI E METODI

Prelievo dei campioni

Lo studio sperimentale è stato eseguito su 16 ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati dal latte di bovine infette provenienti da sette differenti aziende distribuite nel nord-centro Italia, precisamente nelle province di Como, Lecco e Reggio Emilia.

Le aziende zootecniche oggetto di studio sono le state le seguenti:

- azienda agricola “**A**”, situata a Pasturo (LC); 49 capi in lattazione di razza bruna, meticcica e frisona allevati in stabulazione fissa su lettiera di trucioli e paglia; produzione media di 20 kg/305gg; ceppi isolati numero 2043 e 1938.
- azienda agricola “**B**”, situata a Eupilio (LC); 46 capi in lattazione di razza frisona, allevati in stabulazione libera su cuccette con lettiera in segatura; produzione media di 24,1 kg/305gg; ceppi isolati numero 2024 e 2077.
- azienda agricola “**C**”, situata a Ballabio (LC); 37 bovine in lattazione di razza bruna, allevati su lettiera permanente/cuccette; produzione media di 26,4 kg/305gg; ceppi isolati numero 1974 e 2092.
- azienda agricola “**D**”, situata a Cesana Brianza (CO); 30 capi in lattazione di razza bruna, allevati in stabulazione fissa con lettiera costituita da paglia; produzione media di 27,9 kg/305gg; ceppi isolati numero 2086, 2080 e 2090.
- azienda agricola “**E**”, situata a Osnago (LC); 75 bovine in lattazione di razza frisona, allevati in stabulazione libera su cuccette con lettiera costituita da trucioli e materasso; produzione media di 32 kg/305gg; ceppi isolati numero 1939 e 2014.
- azienda agricola “**F**”, situata a Costa Masnaga (LC); 93 capi in lattazione di razza frisona, allevati in stabulazione libera su cuccette con lettiera in segatura, trucioli e materasso; produzione media di 29,7 kg/305gg; ceppi isolati numero 2096 e 2105.
- azienda agricola “**G**”, situata a Reggio Emilia (RE); 180 bovine in lattazione di razza frisona, allevati in stabulazione fissa su cuccette; produzione media di 22 kg/305gg; ceppi isolati numero 2147, 2144 e 2150.

La diagnosi delle infezioni da *S. aureus* è stata eseguita su campioni di latte provenienti dai singoli quarti, utilizzando terreni non selettivi. Il prelievo è stato eseguito in modo asettico, seguendo le procedure indicate dal Dipartimento di Patologia animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria; ciascun capezzolo è stato disinfettato con alcool o clorexidina, i primi getti di latte sono stati scartati e quelli successivi sono stati raccolti in una provetta sterile (volume minimo 5 ml). I campioni sono stati conservati in regime di freddo e immediatamente inviati al laboratorio dove sono stati sottoposti alle analisi citologiche e batteriologiche.

Analisi batteriologiche

Da ogni campione è stata prelevata, mediante un'ansa sterile, un'aliquota di 10 µl di latte, che è stata seminata su terreno agar-sangue (contenente 5% di sangue di bovino defibrinato); successivamente le piastre sono state poste in incubazione in termostato a 37° C per 24 ore.

Le colonie ottenute sono state osservate allo scopo di individuare quelle che presentassero caratteristiche morfologiche tipiche di *S.aureus* (alone emolitico, colore bianco-giallo). Le colonie sospette sono state isolate su agar-sangue, quindi sottoposte a tipizzazione biochimica secondo le indicazioni del "NMC" (*National Mastitis Concil*, 1999).

L'identificazione è stata confermata mediante galleria API Staph ID 32 (Biomerieux Italia); i ceppi identificati correttamente sono stati quindi conservati a -20°C in BHI, brodo contenente il 15% v/v di glicerolo.

Inoltre ogni ceppo è stato differenziato sulla base dell'amplificazione genica con Polimerasi a catena (PCR) e Transia Plate® per la produzione di diverse enterotossine (SEs), come illustrato dalla tabella seguente (**Tab 1**):

N. <i>St. aureus</i> strains			Tox A	Tox D	Tox G	Tox I	Tox J
2080			-	-	+	+	-
2086			-	-	+	-	-
1939			-	+	+	-	-
2014	2105	2096	-	+	-	-	-
1938	2090		-	+	+	+	-
2043			-	+	-	-	-
2024	2077		-	-	+	+	-
2092			+	-	+	+	-
1974			-	+	-	-	+
2150	2144	2147	-	+	+	+	+

Tabella 1. Differenziazione dei diversi ceppi di *S aureus* sulla base della presenza di enterotossine

Preparazione delle colture da analizzare

Prima di iniziare la sperimentazione, i ceppi di *S.aureus* sono stati scongelati, prelevando un'aliquota di sospensione batterica e seminandola su terreno agar-sangue.

Dopo incubazione a 37°C per 18 ore, le colonie sono state sub-coltivate sul medesimo terreno, quindi si è proceduto all'allestimento delle curve di crescita.

Allestimento delle curve di crescita

Per ogni ceppo è stato effettuato il conteggio su piastra valutandone la crescita a tempi differenti, precisamente al momento della semina in brodo e dopo 2, 4 e 7^h di incubazione .

A tal fine sono state stemperate alcune colonie in una provetta contenente 10 µl di brodo triplosio (Oxoid), ed è stata valutata la concentrazione batterica a cui si è fatto riferimento successivamente per l'allestimento della curva di crescita.

La brodocoltura è stata quindi posta in termostato a 37°C ad incubare per 7^h.

Il conteggio su piastra è stato effettuato diluendo serialmente in base 10 la brodocoltura, e seminando 100 µl di ogni diluizione sulla superficie di una piastra di agar sangue. Questa operazione è stata ripetuta due volte, in modo da minimizzare l'errore dovuto all'operatore.

Le piastre sono state poste in termostato a 37°C ed incubate fino al momento della lettura, il giorno successivo.

Sono state quindi contate le colonie tipiche di *S.aureus* cresciute sulle piastre alle diverse diluizioni ed è stato calcolato il valore medio, espresso come “ CFU ” (*Unità Formanti Colonie*).

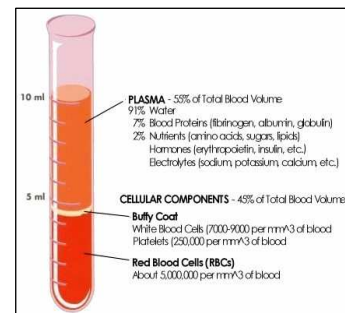
Questa procedura è stata ripetuta dopo 2, 4 e 7^h, prelevando ogni volta 1 ml di brodocoltura dalla provetta allestita all'inizio della prova. Per ogni ceppo è stato quindi calcolato il numero medio delle colonie di *S.aureus* cresciuto durante i diversi tempi di incubazione, da cui sono state ricavate le curve di crescita.

Isolamento dei linfociti

Per il prelievo del sangue sono stati scelti 10 animali in buono stato di salute e intorno ai 100-120 giorni di lattazione. Da ogni vacca sono stati prelevati 10 ml di sangue dalla vena coccigea mediante provetta Vacutainer e le varie aliquote sono state immediatamente trasportate al laboratorio mantenendo la catena del freddo. Il sangue è stato centrifugato a 2000 rpm per 15 minuti, per sedimentare gli eritrociti ed isolare i leucociti.

Dopo centrifugazione infatti è stato possibile distinguere il *buffy coat* contenente la maggior parte di polimorfonucleati (**Figura a lato**).

Da ogni provetta è stato eliminato il plasma, mentre il “ *buffy coat* ” è stato prelevato e inserito in una nuova provetta, quindi è stato sottoposto alla lisi dei globuli rossi: abbiamo aggiunto 20 cc di soluzione ipotonica (S.F. 0.2%) e successivamente 20 cc di soluzione ipertonica (S.F. 1.6%).



Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti, è stato eliminato il surnatante, mentre il sedimento, costituito da leucociti, è stato risospeso in 3 ml di tampone HBSS e stratificato su 3 ml Ficoll, in modo da separare le cellule mononucleate dai polimorfonucleati. Infatti, dopo centrifugazione a 2250 rpm per 15 minuti, i PMN si sono sedimentati sul fondo della provetta, mentre nella metà superiore si è formato un anello di cellule, costituito da monociti e linfociti.

Sono stati quindi prelevati i linfociti, sono stati sottoposti a tre lavaggi successivi in HBSS, centrifugando a 1500 rpm per 10 minuti.

Le cellule sono state infine risospese in HBSS e si è proceduto al conteggio vitale mediante “ Trypan blue ” allo 0.5% (p/v): in una provetta Eppendorf sono stati aggiunti 20 µl di cellule a 140 µl di HBSS e 40 µl di Trypan blu, e dopo cinque minuti tale provetta è stata deposta nella camera di Burker per il conteggio delle cellule vive e morte.

Le cellule sono state diluite ad una concentrazione pari a 1.500.000 cell/ml in RPMI, con l'aggiunta del 10 % di siero fetale bovino.

Preparazione dell'inoculo batterico

I ceppi di *S.aureus* sono stati risospesi in soluzione fisiologica e sono stati portati ad una torbidità pari a 0.5 McFarland, che è stata valutata mediante spettrofotometro a 625 nm: un valore pari a 0.08, corrisponde a 1×10^8 batteri/ml.

Le sospensioni batteriche sono state diluite a 1×10^7 batteri/ml in RPMI, e successivamente sono state poste in frigorifero fino al momento dell'utilizzo.

Per ogni ceppo di *S.aureus* sono state allestite due vials, ognuna contenente 1 ml di cellule; a queste sono stati aggiunti 100 μ l di ogni ceppo di *S.aureus*, mentre in due vials sono stati aggiunti 100 μ l di terreno, poiché rappresentano il controllo negativo.

Le vials sono state poste in termostato a CO₂ ed incubate per 2 e 4^h.

Dopo 2^h è stata estratta dal termostato una serie di vials ed un controllo negativo. Le provette sono state centrifugate in microcentrifuga a 2000 rpm per 4 minuti, è stato eliminato completamente il surnatante e le provette sono state congelate a -80°C.

Questa procedura è stata ripetuta al termine delle 4^h di incubazione.

Estrazione dell'mRNA

L'RNA totale è stato estratto dai linfociti utilizzando la soluzione TRI REAGENT (Sigma, Germania), la quale si basa su una soluzione pronta all'uso, contenente guanidina isotiocianato e fenolo.

L'RNA è stato poi conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Trattamento con DNasi

La retrotrascrizione è avvenuta dopo trattamento con DNasi in modo da evitare l'amplificazione di materiale genomico di tipo desossiribonucleico. Pertanto l'estratto linfocitario è stato messo ad incubare con 1 U dell'enzima DNasi (Amersham Bioscience, UK) per 30 minuti a 37°C e successivamente, per inattivare l'enzima stesso, a 95°C per 5 minuti.

Retrotrascrizione

Per poter applicare la reazione di PCR allo studio dell'RNA, è necessario che questo venga retrotrascritto in un filamento di DNA complementare (cDNA) fornendo così un apposito substrato per le polimerasi: questo processo si chiama Trascrizione Inversa (Reverse Transcription).

Gli enzimi che si utilizzano in questo tipo di reazione sono le trascrittasi inverse dei retrovirus, che sono sostanzialmente DNA-polimerasi-RNA-dipendenti; questi enzimi svolgono, oltre all'attività polimerasica, un'attività RNAsica per cui sono in grado sia di produrre un filamento di DNA a partire da uno di RNA, sia di degradare il filamento di RNA stampo, al fine di evitare la formazione di dimeri RNA-DNA che potrebbero ridurre l'efficienza della reazione della PCR seguente.

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato il Kit “RNA LA PCR” (AMV) Ver.1.1 (Takara, Japan) secondo le indicazioni fornite dal produttore, e come enzima la Reverse Transcriptasi derivante dal Virus della Mieloblastosi Aviare (AMV) (Takara, Japan).

Le coppie di primers per ogni citochina sono state in parte tratte dalla letteratura (58) e in parte disegnate mediante il software Oligo (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA), (Tab.2) per ottenere frammenti di lunghezza massima di 316 bp per ottimizzare al massimo la resa della PCR quantitativa (Bustin , 2000).

Citochina target	Primers forward (5'-3')	Primers reverse (5'-3')	Frame (bp)
IL 8	agctggctggtgctctcttgg	acctgcacaaccttctgcac	262
IFN γ	agcccagatgtagctaaggg	ctccagtttctcagagctgc	216
GADPH	ggcgtgaaccacgagaagtataa	ccctccacgatgccaagt	119

Tab.2 : Disegno dei *primers*

Real Time PCR

La *Real-Time PCR* è una metodica che permette di visualizzare l’andamento della reazione di amplificazione già dalle sue prime fasi, ottenendo una stima quantitativa del prodotto di PCR che si sta formando in contemporanea allo svolgersi della reazione, cioè in tempo reale (“real time”). La misurazione della cinetica della reazione nelle fasi precoci della PCR costituisce un vantaggio rispetto alla PCR tradizionale, che invece necessita della rilevazione dell’avvenuta amplificazione solo quando la reazione ha raggiunto il punto-finale. Questo tipo di rilevazione, però, oltre ad apportare una notevole spesa di tempo e ad essere, alle volte, poco chiarificativa, è limitata in quanto, nelle ultime fasi della reazione si verificano delle differenze nel livello di amplificazione tra i diversi campioni, dovute al consumo di reagenti che avviene con un tasso diverso per ciascun amplificato. Il monitoraggio del prodotto di amplificazione che si va man mano accumulando nella reazione, è reso possibile nella real-time dalla marcatura di primers, di sonde o del prodotto di amplificazione, tramite molecole fluorogeniche. Tra i metodi più comuni, vi è il metodo SYBR Green che sfrutta la capacità di questa molecola di legare il solco minore del doppio filamento di DNA prodotto durante la reazione di amplificazione.

La concentrazione di ogni citochina è stata misurata in 2 tempi differenti per ogni singolo ceppo di *S.aureus* (dopo 2 e 4 ore dall’inizio della stimolazione).

Tutte le reazioni di Real Time PCR sono state messe a punto con il rotore Rotor-Gene 3000 System (Corbett Research, Australia). Le amplificazioni sono avvenute in un volume totale di 25 μ l contenente 1X di SYBR PREMIX Ex Taq Takara, 200 nM per ogni primer forward e reverse, 1X di Rox References Dye e 2 μ l di cDNA come raccomandato dal protocollo del produttore.

Le condizioni di PCR sono riassunte nella tabella successiva (**Tab.3**):

	Temperatura (°C)	Tempo per ciclo	N° di cicli
Inattivazione dell'RNAsi e denaturazione iniziale	94°C	10 min	1 ciclo
Denaturazione	95°C	15 sec	40 cicli
Appaiamento dei primers	52°C IFN γ 55°C IL-8	30 sec	
Estensione del filamento di DNA	72°C	20 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	1 ciclo

Tab.3 : Procedura per la reazione di amplificazione

4.4.3 RISULTATI

Allestimento delle curve di crescita

Il conteggio su piastra dei 16 ceppi di *S.aureus* al momento della semina in brodo e dopo 2, 4 e 7^h di incubazione, ha reso possibile la valutazione della crescita a tempi differenti e l'allestimento delle curve di crescita. Al momento della semina in brodo abbiamo valutato la quantità di colonie presenti: la maggior parte dei ceppi ha oscillato tra le 4.000.000 e le 12.000.000 UFC/ml, mentre per i campioni n° 2144 e 1938, i valori sono stati notevolmente inferiori, aggirandosi sulle 500.000 UFC/ml.

Dopo 2^h il 30% dei ceppi ha duplicato la crescita, un altro 30% l'ha triplicata, mentre i ceppi rimanenti hanno aumentato la carica iniziale di 4-5 volte, ad eccezione del n° 2080 che ha raggiunto un incremento pari a 18 volte il valore di partenza.

A 4^h, la maggior parte dei ceppi ha raddoppiato la crescita rispetto alla semina precedente, mentre il ceppo n° 2144 ha quasi decuplicato la carica e il n° 1938 ha raggiunto un incremento pari a più di 20 volte il valore precedente.

A 7^h la crescita è stata piuttosto omogenea per tutti i ceppi, raggiungendo un valore 3-4 volte superiore a quello riferito alla semina precedente.

Il tasso di crescita riferito all'arco delle 7 ore in cui sono stati studiati i ceppi di *S.aureus*, mostra valori medi compresi fra 20 e 60, con un incremento minimo di 13 ed un massimo di 550.

Le curve di crescita ottenute sono state inserite nel grafico seguente:

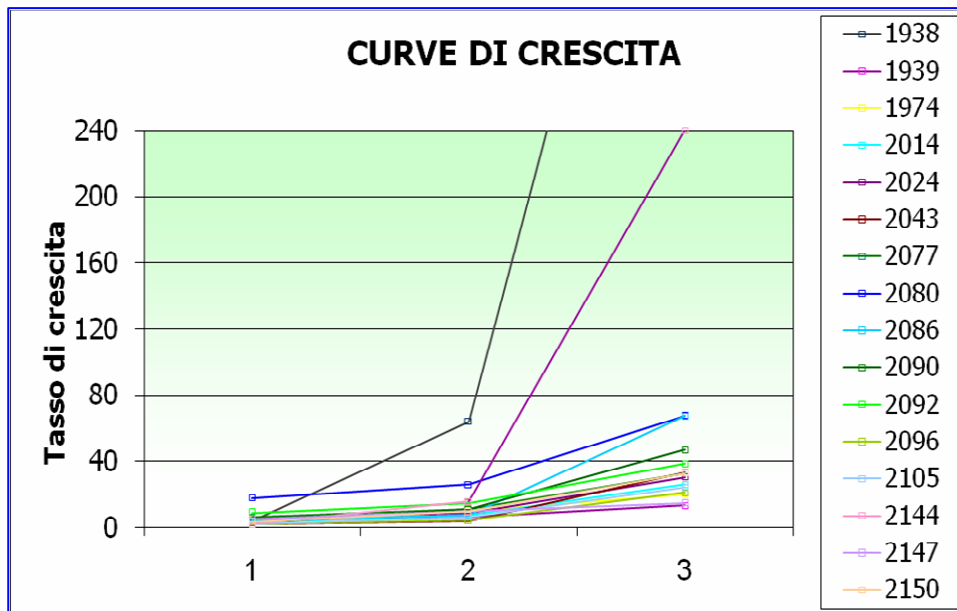


Grafico 1. Rappresentazione grafica della curva di crescita per i diversi ceppi di *S aureus*

Estrazione dell'RNA dalle cellule

Dopo aver posto a contatto i 16 ceppi di *S.aureus* con i linfociti isolati dal sangue delle vacche, abbiamo sottoposto tali cellule all'estrazione dell'mRNA. L'estrazione è stata effettuata a due tempi differenti, precisamente dopo 2 e 4^h dall'inizio dell'operazione, ed è stata valutata tramite lettura spettrofotometrica; ad ogni tempo è stato aggiunto un controllo negativo.

A 2^h l'RNA estratto dalle cellule in esame risulta compreso tra un minimo di 40 ng/μl (ceppo n° 2080) e un massimo di 120 ng/μl (ceppo n° 2150); per il controllo negativo l'mRNA estratto corrisponde a 25 ng/μl. (**Grafico 1**)

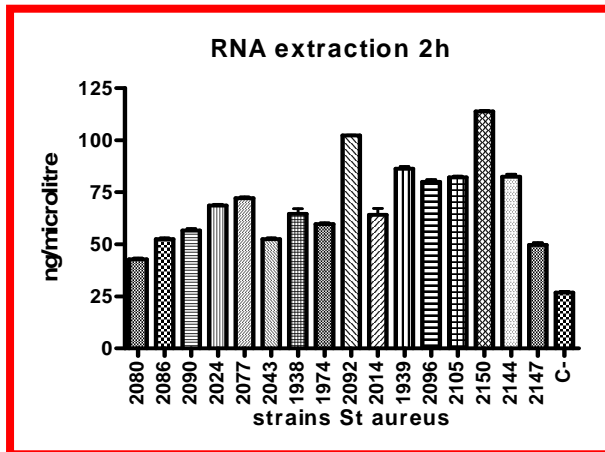
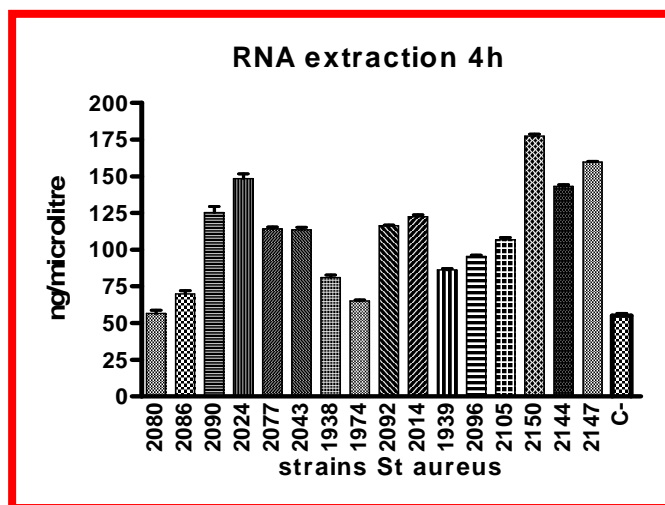


Grafico 1 : Estrazione dell'RNA a 2^h

A 4^h i valori dell'mRNA estratto oscillano tra un minimo di 55 ng/μl (ceppo n° 2080) ed un massimo di 175 ng/μl (ceppo n° 2150). Rispetto alle 2^h, i valori sono meno omogenei ed appaiono piuttosto stabili nel caso di alcuni ceppi (2080, 2086, 2074, 2092, 2096), ma la maggior parte dei ceppi analizzati ha indotto un notevole aumento nella trascrizione dell'mRNA (**Grafico 2**).

Grafico 2:
Estrazione dell'RNA a 4^h



Retrotrascrizione ed espressione dell'mRNA nelle citochine IL-8 e INF γ

L'mRNA estratto dalle cellule è stato retrotrascritto in un filamento di DNA complementare (cDNA), in modo da poter valutare il livello di espressione nelle due citochine IL-8 e INF γ . La concentrazione dell'mRNA di ogni citochina è stata misurata a 2 tempi differenti per ogni singolo ceppo di *S.aureus* ed il controllo positivo a cui facciamo riferimento per poter determinare l'espressione dell'mRNA delle citochine è il gene GADPH, normalmente espresso dalle cellule del sistema immunitario.

Per i campioni 2150, 2144 e 2147, entrambi provenienti dalla stessa stalla, a 4^h non è stato possibile retrotrascrivere nulla, per cui tali ceppi non sono stati inseriti nei grafici riportanti i risultati.

Ad eccezione di questi tre campioni, tutti gli altri ceppi analizzati esprimono l'interleuchina-8 (IL-8). I ceppi che a 2^h hanno manifestato un'espressione significativa per tale citochina sono stati i numeri 2105 e 1939, mentre a 4^h hanno spiccato i numeri 2043 e 2014; le espressioni meno significative si sono evidenziate a 2^h per i ceppi n° 2024 e 2077, e a 4^h per i ceppi n° 1939 e 2105, dove in questo ultimo l'espressione è stata praticamente quasi inesistente (**Grafici 3 e 4**).

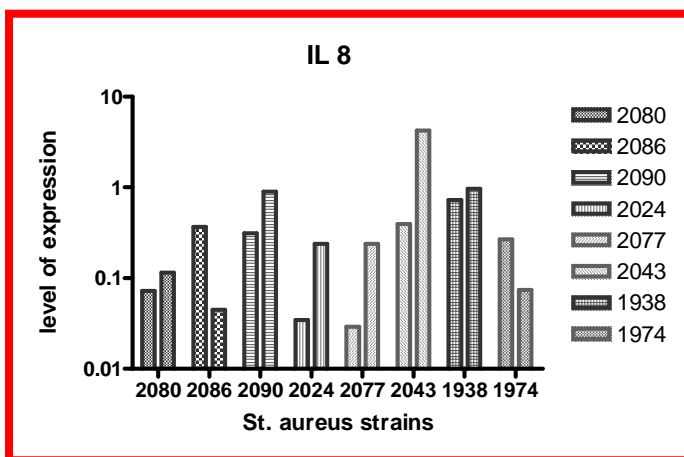


Grafico 3:
Espressione di IL-8 per i diversi ceppi

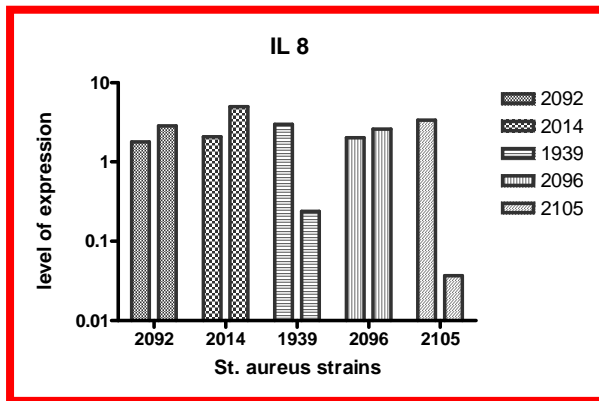
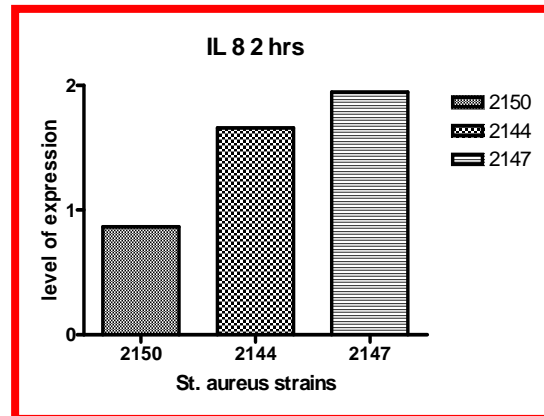


Grafico 4: Espressione di IL-8 per altri ceppi

Per i campioni 2150, 2144 e 2147, la retroscrizione è stata possibile solo a 2^h e il livello di espressione è stato nella norma. (**Grafico 5**)

Grafico 5: Espressione dell'mRNA nell' IL-8 per i tre ceppi retrotrascritti solo a 2^h.



P
e
r
l
,
i
n
t

erferone gamma ($INF\gamma$) sono state espresse quantità modeste in senso assoluto ma in grado di screenare fra i diversi ceppi.

Soltanto 5 campioni hanno espresso l'mRNA nell' $INF\gamma$ per entrambe i tempi, si tratta dei ceppi n° 2086, 2077, 2043, 1938 e 2105; per tutti questi a 4^h c'è stato un incremento notevole dell'espressione, in particolare per i numeri 2086 e 2077; a 2^h l'espressione è stata piuttosto lineare ad eccezione del ceppo n° 2077, per il quale sono stati riportati valori notevolmente inferiori (**Grafico 6**).

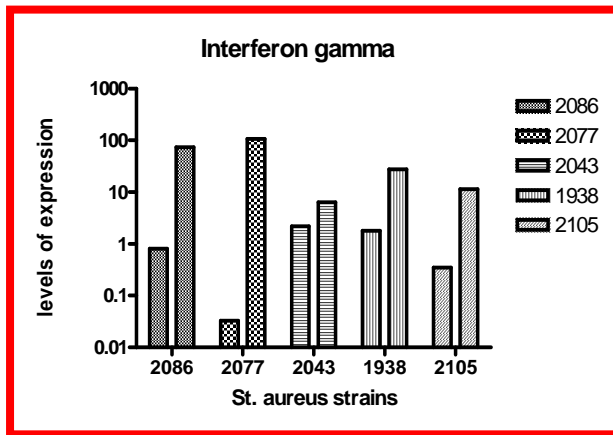


Grafico 6: Espressione di INF γ per entrambi i tempi i tempi sperimentali considerati.

I ceppi n° 2090, 2024, 1974 e 1939 hanno espresso l'mRNA nell'INF γ solamente a 2^h, mentre i ceppi n° 2080, 2014 e 2096 solamente a 4^h. A 2^h l'espressione è stata variabile; il campione che ha spiccato è stato il numero 1939, mentre quello che ha avuto un'espressione lieve è stato il n° 2090. (**Grafico 7**)

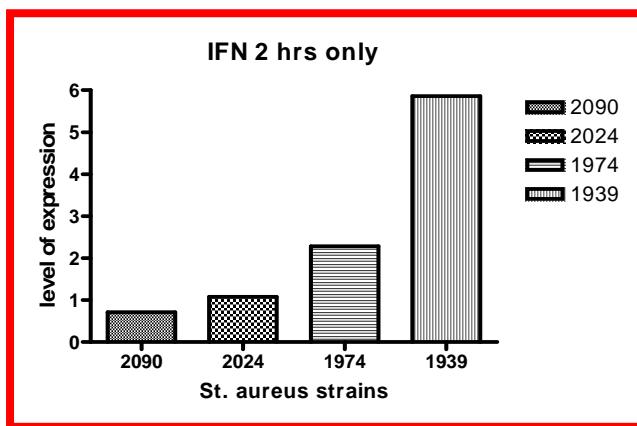


Grafico 7: Espressione INF γ solamente a 2^h.

Anche a 4^h l'espressione è stata alquanto variabile: relativamente bassa per i ceppi n° 2014 e 2096, e abbastanza alta per il n° 2080. (**Grafico 8**)

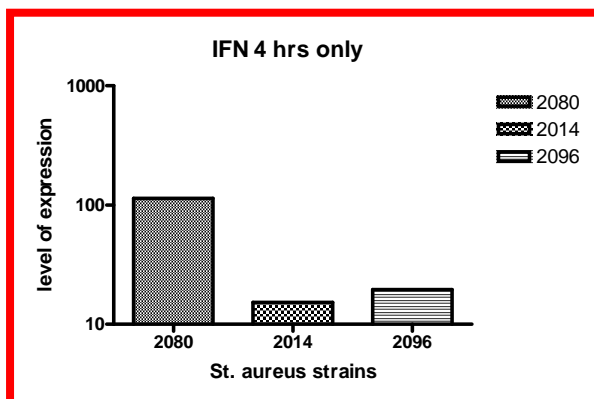


Grafico 8: Espressione di INF γ solamente a 4^h.

4.4.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Per questo studio preliminare sono stati volontariamente utilizzati ceppi di *S.aureus* isolati da mastiti subcliniche in allevamenti diversi, scelti sulla base delle manifestazioni osservate a carico della mammella, e che si differenziano per il tipo e il numero di enterotossine prodotte.

I linfociti sono stati estratti dal sangue di vacche sane, provenienti dalla stessa stalla dove non si è mai riscontrata positività verso il patogeno in questione, questo per non avere interferenze dovute all'acquisizione di un'immunità in seguito al contatto con *S.aureus*.

L'espressione di mRNA è stata valutata dopo 2 e 4^h di stimolazione da parte dei diversi ceppi, in quanto i risultati delle loro curve di crescita hanno evidenziato valori molto diversi: alcuni mostrano la massima accelerazione nella moltiplicazione già a 2^h, altri a 4^h.

I risultati relativi alla quantità di mRNA espresso dopo stimolazione da parte dei ceppi di *S.aureus* mostrano un'espressione differente dell'mRNA delle citochine infiammatorie, in accordo a quanto segnalato da Leutenegger C.M e Bustin S.A. (Leutenegger *et al.*, 2000; Bustin, 2000).

Dai risultati ottenuti si è potuto notare che in tutti i campioni è stata estratta una quantità elevata di mRNA e per entrambe le citochine (IL-8 e INF γ) sembra che a 4^h ci sia un incremento dell'espressione nel tentativo di fare fronte alla proliferazione batterica.

I linfociti appaiono stimolati per cui esprimono una quantità di mRNA molto superiore rispetto a quella espressa dal controllo negativo, ma il grado di stimolazione varia da un ceppo all'altro. Questo risultato, se confermato da ulteriori studi, potrebbe aiutare a spiegare la diversa evoluzione delle mastiti da *S.aureus* nelle aziende di vacche da latte.

Oggetto di discussione è la scarsissima espressione di mRNA nei linfociti messi a contatto con i tre ceppi 2150, 2144 e 2147, tutti provenienti dalla stessa stalla. Le ipotesi sono due: un RNA danneggiato che ha reso difficile la retrotrascrizione, oppure un danno cellulare tale ad opera degli stafilococchi da causare la morte dei linfociti, per cui l'mRNA estratto sarebbe di derivazione batterica. Questa ipotesi è supportata dalla dimostrazione che i tre ceppi sono gli unici che codificano per 4 SE (D, G, I e J).

Un altro aspetto interessante è il diverso comportamento dei ceppi all'interno della stessa azienda, infatti la risposta linfocitaria cambia e le differenze sono indipendenti sia dalla velocità di replicazione, che potrebbe favorire una sintesi di SE più o meno precoce, sia dalla capacità di produrre tossine.

Per quanto riguarda l'IL-8, a parte i ceppi n° 2024 e 2077 provenienti dalla stessa stalla che hanno eccezionalmente stimolato l'espressione di mRNA in modo molto simile sia a 2 che a 4^h, tutti gli altri ceppi hanno evidenziato una attività differente, generalmente però i livelli di mRNA sono risultati significativamente superiori a 4^h.

Anche per l'INF γ non si è verificato un andamento comune dei ceppi all'interno della stessa stalla e inoltre soltanto cinque campioni hanno espresso l'mRNA nell'INF γ per entrambe i tempi: infatti alcuni ceppi hanno stimolato espressione esclusivamente a 2 o a 4^h. La spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere imputabile da una parte ad una mancata stimolazione linfocitaria a 2^h, dall'altra ad una reazione a feed-back dopo le 2^h di contatto coi batteri, per cui l'mRNA prodotto sarebbe stato degradato.

Confrontando i valori dell'mRNA espresso nelle due citochine, si può notare come per l'INF γ l'espressione sia notevolmente inferiore rispetto all'IL-8: questo risultato può essere spiegato dal fatto che i linfociti sono stati isolati da animali che non sono mai venuti a contatto con *S.aureus* e che quindi non hanno sviluppato un'immunità verso tale patogeno. D'altra parte, il ritardo o la mancata produzione di INF γ causati da diversi ceppi, possono giocare un ruolo importante nell'instaurazione di uno *shift* dell'immunità verso il tipo **Th2**, meno efficace rispetto al **Th1**, nei confronti di questo patogeno.

Per quanto riguarda IL-8, i linfociti appaiono notevolmente stimolati da parte di tutti i ceppi, a dimostrazione dell'attività infiammatoria svolta da *S.aureus*.

Questo lavoro ha evidenziato come diversi ceppi di *S.aureus*, caratterizzati da differenti attività metaboliche, siano in grado di provocare una diversa risposta immunitaria, considerata come produzione di citochine, in animali che non sono mai stati a contatto con tale patogeno.

Potrebbe essere interessante verificare la risposta adattativa, analizzando l'espressione delle interleuchine principali, in modo da correlare il decorso della mastite da *S.aureus* con il ceppo responsabile.

4.5 Sperimentazione 5

Valutazione della risposta immunitaria mediante quantificazione citochinica in soggetti persistentemente infetti da Virus della Diarrea Virale Bovina

4.5.1 INTRODUZIONE

Il complesso Diarrea Virale Bovina-Malattia delle Mucose (BVD-MD), sostenuto da un virus appartenente al genere *Pestivirus*, famiglia Flaviviridae, costituisce un quadro patogenetico articolato, caratterizzato da un variegato complesso di segni clinici. Le maggiori perdite dovute alle infezioni da BVD sono dovute ad infertilità ed infezione intrauterina con conseguente nascita di soggetti persistentemente infetti (PI). Inoltre, in associazione a forme gastro enteriche e al tropismo del virus per la mucosa dell'apparato respiratorio, assume notevole rilievo l'attività immunosoppressiva esercitata dal virus che facilita l'insorgenza di forme secondarie che vanno a sovrapporsi all'infezione virale trovando soggetti incapaci di elaborare una risposta immunitaria efficace.

Lo studio dello stato di immunosoppressione presente sia nei soggetti con infezione acuta sia nei soggetti persistentemente infetti e il ruolo rivestito dalle cellule infette nel controllo della risposta immunitaria innata e acquisita, costituiscono per questa malattia la chiave di lettura per capire il continuo cambiamento nell'interazione fra animale infetto e virus (Chase *et al.*, 2004).

Collen e Morrison (2000) hanno dimostrato come la risposta umorale non sia sufficiente per eliminare l'infezione, rendendo necessario il coinvolgimento dell'immunità cellulo-mediata. Questa immunità, è a sua volta compromessa a seguito di una riduzione della funzionalità dei macrofagi, monociti e cellule dendritiche. Prove di infezione *in vitro* dimostrano, infatti, che un numero variabile di monociti si infettano, producono progenie virale, vanno in apoptosi quando infettati con un ceppo citopatogeno (Cp) di BVDV e rilasciano una serie di fattori solubili in grado di determinare l'apoptosi di monociti sani e linfociti (Lambot *et al.*, 1998). Ulteriori studi *in vitro* dimostrano che l'infezione con BVDV sia esso appartenente a ceppi Cp o non citopatogeni (NCp), deprime l'attività fagocitaria dei macrofagi alveolari poiché causa una riduzione del recettore per la frazione costante (Fc) delle immunoglobuline, un decremento dell'attività microbica e della liberazione dei fattori chemiotattici (Peterhans *et al.*, 2003).

Nel nostro studio abbiamo considerato l'espressione genica di due molecole solubili appartenenti alla classe delle citochine. Tali molecole, infatti, svolgono un ruolo immunomodulante capace di regolare e indirizzare la risposta dell'ospite verso l'agente determinante flogosi. In particolare la nostra indagine si è focalizzata sul ruolo dell'interleuchina 8 (IL-8) e sull'interferone- γ (IFN- γ).

L'IL-8 è una chemochina proinfiammatoria appartenente alla sottofamiglia CXC che raggruppa chemochine che regolano la migrazione dei leucociti ed è coinvolta nella proliferazione di cellule progenitrici mieloidi (Oppenheim *et al.*, 1991; Laterveer *et al.*, 1995). IL-8 è secreta da una moltitudine di cellule comprendenti monociti, linfociti, granulociti, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule dell'epitelio bronchiale, cheratinociti, cellule mesangiali, epatociti, e condrociti (Middleton *et al.*, 1997). Sotto stimoli infiammatori tale proteina è in grado di svolgere attività chemiotattica con il richiamo e l'attivazione dei neutrofili *in primis*, induce una maggior espressione delle molecole d'adesione (Paccaud *et al.*, 1990), oltre ad indurre angiogenesi.

L'interferone (IFN), invece, è una delle più importanti citochine difensive antivirali. Il trattamento di leucociti o di cellule muscolari fetali con alte dosi (10^4 unità/mL) di interferone *alpha* (IFN- α) di natura umana previene la replicazione *in vitro* sia di ceppi Cp sia NCp, anche se non riesce ad evitare l'infezione o la replicazione in soggetti persistentemente infetti (Sentsui *et al.*, 1998).

Sicuramente l'infezione con BVDV Cp induce una produzione di IFN- α che svolge un ruolo ancora non ben definito nell'apoptosi delle cellule infette (Perler *et al.*, 2000). Nel caso di ceppi NCp si assiste ad una minor produzione di IFN- α a causa dell'inibizione della sintesi di RNA messaggero, e all'inibizione dell'apoptosi cellulare indotta da RNA a doppio filamento (dsRNA). Anche le proteine virali E2 e NS5A inibiscono l'apoptosi indotta dal dsRNA e l'attività antivirale dell'INF mediante un'interazione diretta con la proteina chinasi R (Schweizer *et al.*, 2001).

Correlando il meccanismo di persistenza e il ruolo dell' INF di tipo I si è ipotizzato come nel caso di biotipi Cp l'infezione del feto induca una produzione di tali interferoni che non permette lo stabilirsi dell'infezione persistente, cosa che non avviene in biotipi NCp (Charleston *et al.*, 2002). Poiché l'apoptosi e la risposta da interferone sono stati rilevati soprattutto nei primi mesi di gestazione, l'evasione da questi due sistemi di immunità innata rappresenta un punto cruciale per la trasmissione al feto e conseguentemente il mantenimento della immunotolleranza (Schweizer *et al.*, 2001).

L'interferone gamma (IFN- γ) è una citochina regolatrice della risposta antigene specifica e svolge il suo effetto sulle Antigen Presenting Cells (APCs) e sui linfociti T e B. Inoltre, ha un ruolo proinfiammatorio attraverso la sua azione d'attivazione di macrofagi e cellule endoteliali ed è in grado di aumentare l'espressione del complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC).

La produzione d'IFN- γ è una prerogativa dei linfociti T helper di tipo 1; infatti, alti livelli di produzione di IFN- γ sono associati ad una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediato verso patogeni intracellulari e in patologie autoimmuni da cui dipende una ipersensibilità di tipo ritardato. In condizioni normali la produzione di tale mediatore rimane a livelli basali, mentre, imponenti quantitativi vengono prodotti in circostanze patologiche quali trauma, infezioni, neoplasie e processi autoimmuni.

L'attività antivirale esercitata dall' IFN- γ è inferiore rispetto agli interferoni di tipo I (IFN β e IFN α), ma come tali molecole è in grado di indurre una depressione del gene 2',5'-oligoadenilsintetasi e della proteina chinasi dsRNA-dipendente che attribuiscono un largo spettro antivirale alle cellule.

Anche in caso di Malattia delle Mucose (MD) sembra che il sistema immunitario sia coinvolto nella patogenesi della malattia, in particolare il rilascio di fattori solubili quali appunto le citochine da parte dei macrofagi infettati con BVDV Cp determina l'apoptosi anche in cellule epiteliali sane e questo appunto potrebbe essere il meccanismo coinvolto nella patologia associata al tessuto linfoide (Teichmann *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 1997).

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare lo stato di immunodepressione in soggetti persistentemente infetti con BVDV. In particolare è stata valutata la compromissione dell'attività microbica, chemiotattica e la citotossicità anticorpo dipendente dei neutrofili mediante quantificazione dell'IL-8 e l'azione dell'infezione persistente sulla risposta cellulo-mediata dei linfociti Th1 tramite la quantificazione dell'IFN- γ nonché la presenza di BVDV mediante quantificazione dell'RNA virale. L'espressione genica è stata stimata tramite quantificazione assoluta con real time PCR (Bustin, 2000, Overbergh *et al.*, 2003).

4.5.2 MATERIALI E METODI

Animali

I campioni utilizzati sono stati prelevati da animali persistentemente infetti da BVDV (PI) (69 campioni) e da animali sani (19 campioni).

I soggetti PI sono stati definiti tali in quanto risultati positivi alla ricerca dell'antigene effettuata tramite PCR su buffy coat di due prelievi ematici eseguiti a distanza di 30 giorni. I campioni provenienti da soggetti sani sono stati prelevati in sede di macellazione da animali che non presentavano nessuna alterazione riferibile a patologie e risultati negativi alla ricerca del BVDV tramite PCR.

Gli animali, di sesso femminile, avevano un'età inferiore all'anno di vita e provenivano da allevamenti siti nelle province di Padova, Vicenza e Bologna. Nell'anamnesi non figuravano vaccinazioni a carico di alcun animale considerato.

Per ciascun soggetto sono stati esaminati gli organi linfoidei drenanti compartimenti anatomici dell'apparato gastro-enterico (linfonodi mesenterico, del grosso intestino, omasale, ruminale e placche del Peyer), dell'apparato respiratorio (tonsille, linfonodi faringeo, mediastinico e tracheale) e altri organi del sistema linfoide (milza, linfonodi prescapolare, precurale ed inguinale) creando tre gruppi di indagine.

Quantificazione citochinica e virale

L'RNA cellulare totale è stato estratto con Triagent (Sigma®, Germany) in accordo con il protocollo suggerito dal produttore. Tutti i campioni di RNA sono stati trattati con l'enzima DNasi al fine di impedire l'amplificazione di materiale desossiribonucleico. La retrotrascrizione è avvenuta in un volume totale di 20 µl contenente RT-PCR Buffer 1X, MgCl₂ Solution (5 mM), dNTP Solution (250 µM per ogni dNTP), Random Hexamers (2,5 µM), Rnase Inibitore (1 U/µl), Trascrittasi inversa (0,25 U/µl). Il cDNA ottenuto è stato mantenuto a -80 °C fino all'uso.

I primers utilizzati per l'amplificazione delle citochine, del gene housekeeper GAPDH e dell'RNA virale sono descritti in tabella 1.

Tabella. 2.1.

Sequenze oligonucleotidiche utilizzate per l'amplificazione dei geni target (*Leutenegger et al, 2000).

Citochina	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
GAPDH*	ggcgtgaaccacgagaagtataa	ccctccacgatgccaaagt	119
IL 8	agctggctgttgcctcttgg	acctgcacaaccttctgcac	262
IFN γ	aattattcagagccaaatt	ctccagtttctcagagctgc	142
BVD virus	agatgccacgtggacga	gcaccctatcaggetgt	109

I prodotti di PCR purificati per ogni citochina e per il genoma virale sono stati clonati in un plasmide, trasformati in *E. Coli* TOP 10 con Topo TA Cloning (Invitrogen, USA) e purificati con Turbo Kit (QBIogene, USA). I plasmidi ottenuti sono stati linearizzati tramite l'uso di enzimi di restrizione e diluiti in base 10 per tracciare la curva standard di riferimento. Almeno 6 diluizioni sono state incluse in ogni real time PCR per calcolare le concentrazioni delle citochine e del virus. Il valore assoluto ottenuto è stato rapportato al valore assoluto del gene housekeeper al fine di normalizzare tali quantità esprimendoli graficamente secondo una scala logaritmica (**Fig. 3**) (Bustin, 2000).

Le reazioni di real time PCR sono state condotte con Rotor-Gene 3000 System (Corbett Research, Australia). Le amplificazioni sono avvenute in un volume totale di 25 μ l contenente 1X di SYBR PREMIX Ex Taq (Takara, Giappone) 200 nM per ogni primer, 1X di Rox References Dye e 2 μ l di cDNA. I parametri di ogni ciclo sono stati i seguenti: 10 minuti a 95°C di denaturazione iniziale seguiti da 40 cicli di 15 secondi a 95°C, 15 secondi di annealing (IFN γ 54°C, IL-8 55°C, GAPDH 56°C, BVDV 52°C) 20 secondi a 72°C. Il segnale di emissione della fluorescenza è stato rilevato sul canale FAM (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) alla fine della fase di estensione (**Fig. 2.1**).

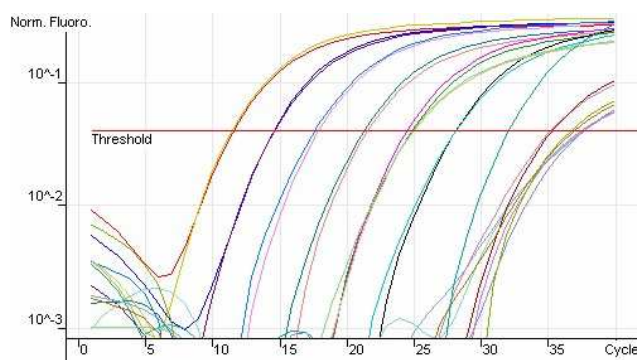


Fig. 2.1: curva che rappresenta l'emissione di fluorescenza del singolo campione correlata al quantitativo di doppi filamenti in base al ciclo considerato.

Per differenziare i prodotti specifici dai non specifici e dai primer dimers, è stata tracciata una curva di melting dopo l'amplificazione mantenendo la temperatura a 72°C per 12 secondi seguiti da gradual aumenti di 0,1°C/secondo fino a raggiungere i 95°C, con l'acquisizione della fluorescenza in ogni step sul FAM channel (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) (**Fig. 2.2**).

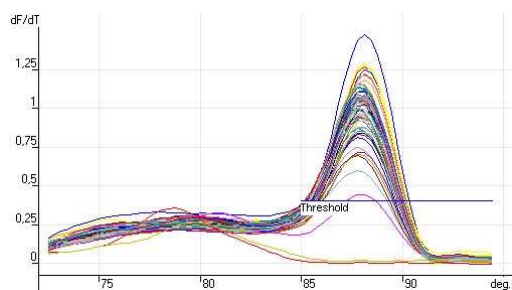


Fig 2.2: curve di melting dei frammenti amplificati per valutare la specificità durante l'amplificazione e l'eventuale presenza di prodotti aspecifici.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è avvenuta mediante GraphPad Software versione 4.0 con test Wilcoxon per dati non parametrici per quanto concerne le 2 citochine mentre si è utilizzato un fit non lineare multiparametrico per valutare l'eventuale correlazione fra carica virale ed espressione di entrambi i mediatori infiammatori. I valori sono stati considerati significativi per $P < 0.05$.

4.5.3 RISULTATI

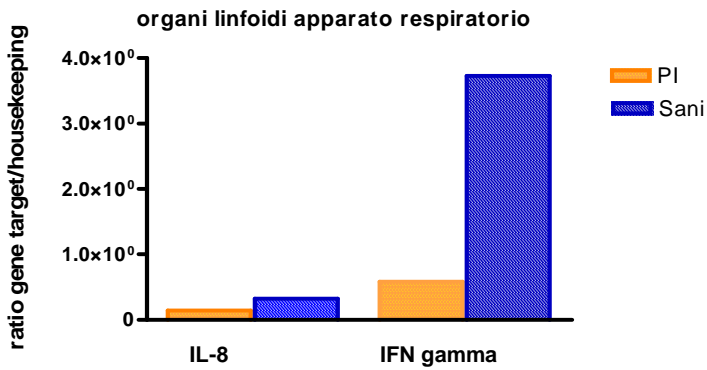


Fig. 2.3: Espressione di IL-8 e INF- γ negli organi linfoidi dell'apparato respiratorio

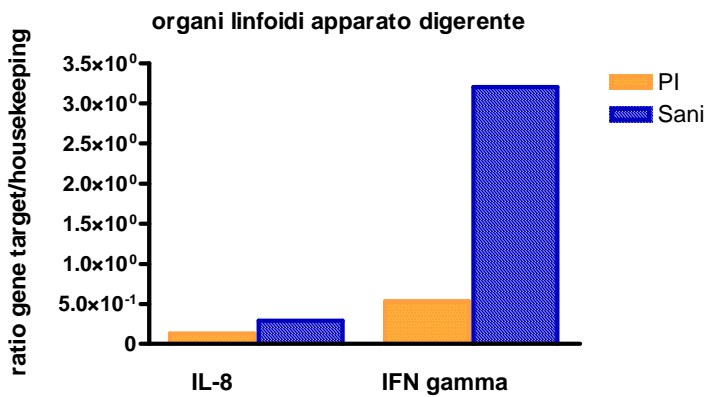


Fig. 2.4 Espressione di IL-8 e INF- γ negli organi linfoidi dell'apparato digerente

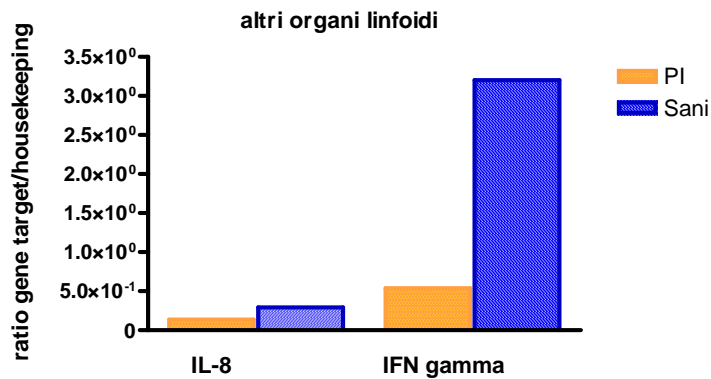


Fig. 2.5 Espressione di IL-8 e INF- γ negli altri organi linfoidi

La valutazione dell'espressione di entrambe le citochine mostra come vi sia una differente espressione sia per IL-8 che per IFN- γ fra animali persistentemente infetti ed animali sani. In particolare per ciò che concerne l'interferone di tipo gamma la differenza fra i due valori di espressione è graficamente rilevante mentre per l'IL-8 tale differenza è meno palese. Ciò è applicabile indistintamente a tutti gli organi linfoidi dei tre compartimenti anatomici considerati come sede di prelievo; si può inoltre valutare anche come i valori, graficati appunto come rapporto assoluto con il gene housekeeping GAPDH, siano molto simili fra organi linfoidi drenanti l'apparato digerente, respiratorio e altri organi linfoidi (**Fig 2.4**).

L'analisi statistica effettuata attraverso test di Wilcoxon per dati non parametrici ha mostrato come tale evidenziazione di tipo grafico sia avvalorata da un supporto di tipo statistico evidenziando per i dati riguardanti l'IFN- γ una significatività altamente statistica ($P=0,001$).

mentre per ciò che concerne l'IL-8 tale differente espressione non si è rilevata statisticamente significativa (P=0,39).

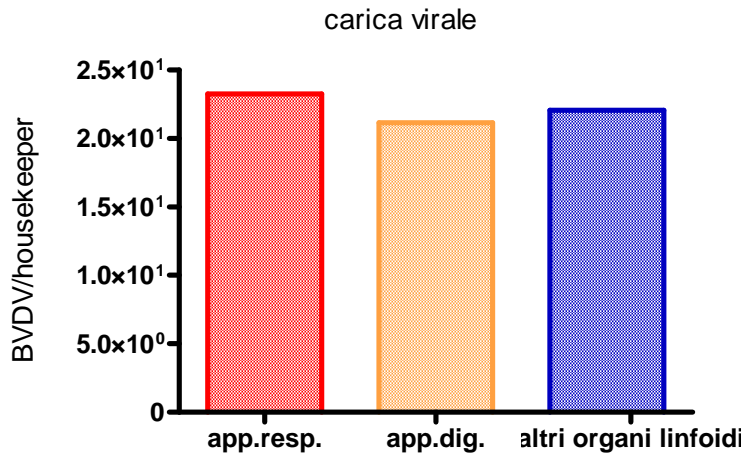


Fig. 2.6.
Carica virale in organi linfoidi

La valutazione di una eventuale relazione fra carica virale (**fig. 2.6**) ed espressione delle 2 citochine ha evidenziato una correlazione fra i 3 parametri esprimibile attraverso la seguente formula matematica:

$$\frac{4806,18 \times \text{IL-8} \times \text{IFN-}\gamma}{1 + 132,8 \times \text{IL-8} - 97,6 \times \text{IFN-}\gamma} \quad (1)$$

Tale espressione matematica, rappresentato dal grafico tridimensionale in **fig. 5**, ha mostrato una correlazione statistica di notevole valore biologico con un $R^2=0,6$. Ciò sta ad indicare come il 60% della variazione nell'espressione dei due geni target di tipo immunitario sia imputabile ad una diversa carica virale all'interno dell'organo linfoide considerato.

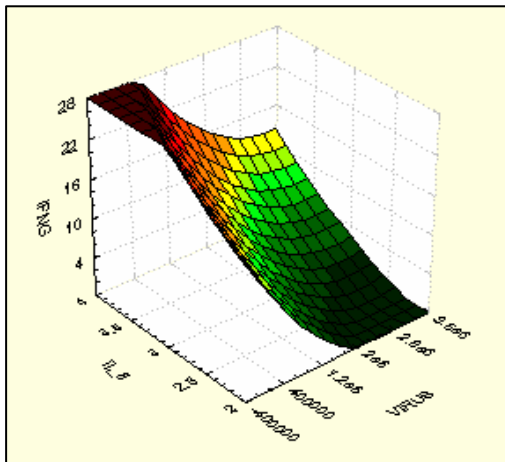


Fig. 2.7.
Rappresentazione tridimensionale della funzione matematica illustrata sopra (1).

4.5.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio in esame aggiunge un nuovo tassello nel mosaico di difficile comprensione costituito dalla BVDV. In particolare viene confermato l'effetto immunodepressivo esercitato da tale *Pestivirus*, elemento fino ad ora poco approfondito soprattutto per quanto concerne i soggetti immunotolleranti e persistentemente infetti.

Numerosi studi infatti si sono occupati dell'immunodepressione esercitata in corso di infezione acuta valutando l'azione esercitata da tale virus sulle varie componenti cellulari.

La particolarità della nostra indagine è quella di rivolgersi a mediatori quali quelli citochinici coinvolti a monte della risposta di tipo cellulare.

In particolare il ruolo dell'IL-8 era stato indirettamente considerato mediante l'inibizione della risposta chemiotattica dei neutrofili e dei macrofagi (Potgetier *et al.*, 1995; Adler *et al.*, 1996) valutando anche un coinvolgimento della componente citochinica (TNF α) mentre Chase *et al.*, (2004) riportano come vi sia un incremento delle infezioni microbiche secondarie a seguito di una minor attività chemiotattica.

Nel nostro studio non si è rilevata un'espressione di IL-8 statisticamente differente fra organi linfoidi di soggetti PI e sani evidenziando come, in corso di infezione persistente da BVDV, non vi sia una variazione significativa di tale parametro. Ciò non fa che avvalorare le precedenti indagini in cui appunto non si assiste ad un aumento della componente neutrofilica in seguito a questa infezione. Inoltre non abbiamo rilevato un coinvolgimento di tale mediatore umorale all'aumentare della replicazione virale come dimostrato in altre patologie di natura virale (Khabar *et al.*, 1997; Murayama *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda invece il ruolo dell'IFN- γ questo ha coinvolto un maggior numero di ricerche considerando appunto l'azione antivirale ad esso da tempo riconosciuto.

In generale l'azione esercitata dalla classe di interferoni tipo I (IFN- β e IFN- α) pare sia la chiave di lettura per la comprensione della nascita di soggetti PI; il biotipo Cp è infatti in grado di innescare la produzione di IFN tipo I in grado di determinare la morte del feto mentre nel caso di ceppi NCp questi riescono a sfuggire alla risposta mediata da tale mediatore determinando l'infezione persistente nel feto.

La nostra indagine ha mostrato come in seguito alla presenza del virus della BVDV vi sia una minor espressione soprattutto dell'IFN- γ valutando come l'effetto del virus in soggetti PI si espliciti prevalentemente sulla risposta di tipo cellulo-mediata. Questo dato era già emerso nello studio di Brodersen *et al.*, (1999), che rilevavano una maggior deplezione dei linfociti di tipo CD8+: ciò si evidenziava mediante analisi microscopica su milza, linfonodi, timo, tonsille e milza in corso di infezione con ceppi NCp altamente virulenti.

La capacità di inibire la risposta di tipo cellulo-mediata è stata rilevata appunto, soprattutto in corso di infezioni con biotipi di tipo non citopatogeno capaci appunto di far *shiftare* verso una risposta immunitaria mediata dai linfociti Th2 evitando una elevata immunità di tipo cellulo-mediata (Lambot *et al.*, 1997).

Ceppi non citopatogeni inducono nei soggetti infetti una risposta soprattutto dei linfociti Th2 risultante in un aumento dell'attività dell'IL-4 e delle quantità di fattore di crescita per i linfociti tipo B (Rhodes *et al.*, 1999). Gli stessi autori hanno rilevato come il ruolo dei linfociti citotossici mediato dalla produzione di IL-2 e IFN- γ sia importante soprattutto nella fase acuta della malattia in vacche sieropositive.

Tale dato va comunque interpretato all'interno di un più vasto disegno di fattori umorali e cellulari nel quale appunto si inseriscono IL-8 e IFN- γ ma, per le informazioni ottenuti da questo studio e per la loro validità statistica, tale raccolta di dati rappresenta un'ulteriore informazione nell'inquadrare gli aspetti di natura patogenetica alla base di tale agente infettivo.

Inoltre valutando la carica virale presente all'interno del singolo organo linfoide considerato, si è dimostrato come questo spieghi, per un 60%, la variazione nell'espressione citochinica dei due mediatori umorali da noi considerati. Ciò è importante in quanto il maggior tropismo per un

determinato distretto può giustificare, in tal modo, la comparsa di infezioni secondarie catalizzate dall'effetto immunodepressivo esercitato dal virus stesso.

4.6 Sperimentazione 6

Variazioni della citomorfologia e dell'espressione genica di alcune citochine in corso di RAO sperimentalmente indotta in cavallo sportivo

4.6.1 INTRODUZIONE

L'ostruzione ricorrente delle vie aeree, Recurrent Airway Obstruction (RAO), è una patologia conosciuta da tempo che colpisce soprattutto cavalli allevati in stabulazione permanente caratterizzata da marcato broncospasmo associato ad ipertrofia della parete bronchiale e aumentata produzione di muco.

La RAO del cavallo mostra una maggior incidenza nell'emisfero australe (presumibilmente legata alla tipologia di allevamento), non presenta predilezione di razza o di sesso, ma è stata dimostrata una predisposizione familiare, e colpisce prevalentemente soggetti di età superiore ai 7 anni.

Di questa patologia è nota l'eziologia multifattoriale, che comprende pollini, miceti, acari della polvere ed endotossine batteriche ma l'esatto meccanismo, capace di scatenare ed indurre la cronicizzazione del processo, non è ancora stato chiarito in maniera esauriente (Pirie *et al.*, 2003).

Risulta ormai certa una evoluzione bifasica della malattia: un'iniziale reazione di ipersensibilità di primo tipo, di breve durata, è seguita da una reazione di ipersensibilità del terzo tipo, determinata dalla presenza di endotossine di origine batterica e vegetale, con marcato richiamo di neutrofili nel lume bronchiale.

E' stato inoltre accertato come le endotossine siano in grado di indurre una maggior attività del Nuclear Factor kB (NF kB) da parte di cellule epiteliali, linfociti, mastociti e piastrine, cui segue la produzione di PAF, TNF-alfa, IL-1beta, IL-8, Leukotriene B4 e Integrina ICAM-1 oltre a serotonina, istamina e 15-HETE (Robinson *et al.*, 1996).

Queste citochine costituiscono il *primum movens* cui segue la liberazione a cascata di numerose altre citochine ed il richiamo nel lume bronchiale dei neutrofili che, a loro volta, a seguito della lisi, liberano prodotti istotossici, quali perossidi, elastasi, collagenasi e mieloperossidasi, con conseguente danneggiamento del tessuto bronchiale. Inoltre è stata dimostrata in corso di RAO la liberazione di MMP-9 e la riduzione delle PGE2, potenti inibitori della bronco costrizione.

Questa condizione determina una modificazione della parete bronchiale con infiltrazione linfocitaria nella sottomucosa e lesione dell'epitelio con aumento della produzione di cellule mucipare a scapito delle cellule epiteliali ciliate portando ad una marcata riduzione della clearance muco ciliare.

Si evidenzia pertanto uno squilibrio tra componente bronco costrittiva (regolata dal parasimpatico, attraverso l'attivazione dei recettori muscarinici M3, e dal sistema eccitatorio non adrenergico non colinergico) e bronco dilatativa (regolata dal simpatico e dal sistema inibitorio non adrenergico-non colinergico) con prevalenza della prima.

Dal punto di vista clinico la malattia è caratterizzata da ricorrenti fasi dispnoiche indotte dal ripetuto contatto con gli allergeni, caratterizzate da tosse produttiva, incremento dell'ampiezza e frequenza del respiro, narici dilatate e respirazione dicrota e discordante, da un aumento del volume polmonare, apprezzabile alla percussione, associato ad iperfonesi marginale, e dal reperto auscultatorio di sibili e rantoli a piccole bolle.

Le tecniche di diagnostica strumentale più idonee sono rappresentate dall'endoscopia (utile sia per la visualizzazione che per il campionamento del muco presente nei bronchi principali) o dal lavaggio bronco alveolare (BAL).

Sui campioni di BAL si possono effettuare più tipi di analisi: l'esame citologico, che risulta caratterizzato da una prevalenza di neutrofili in assenza di segni di lisi, e la determinazione delle citochine coinvolte nell'induzione e cronicizzazione del processo.

Nonostante la RAO sia stata oggetto di numerose ricerche, ad oggi le fasi di induzione, mantenimento e remissione della patologia risultano ancora poco chiare, anche per la mancata standardizzazione dei tempi di acquisizione del materiale da esaminare (Kleiber *et al.*, 2005, Cordeau *et al.*, 2005; Lavoie *et al.*, 2001), con risultati, di conseguenza, difficilmente confrontabili.

Pochi autori inoltre hanno considerato contemporaneamente un vasto panel di citochine (Ainsworth *et al.*, 2003; Giguere *et al.*, 2002; Kleiber *et al.*, 2005) limitandosi a valutare una sola (Debrue *et al.*, 2005; Franchini *et al.*, 2000), due o tre (Bowles *et al.*, 2002; Cordeau *et al.*, 2004) citochine in corso di RAO.

Scarse informazioni sono inoltre disponibili sull'effetto terapeutico esercitato dalla somministrazione di antinfiammatori (Giguere *et al.* 2002; Leguillette, 2003), quale ad esempio il lavoro pubblicato da Giguère *et al.* (2002) che valuta l'effetto esercitato dal fluticasone propionato nel ridurre sintomatologia e i markers di flogosi.

Ulteriore elemento che riduce la possibilità di un confronto adeguato tra i singoli lavori è rappresentato dalla tipologia delle cellule che producono le citochine (linfociti piuttosto che cellule epiteliali, macrofagi o neutrofili) e dal materiale esaminato, che, nella maggior parte dei casi, è rappresentato da trascritto (mRNA) e solo in rari casi dal tradotto (proteina).

Il contributo sperimentale della presente tesi consiste in uno studio longitudinale effettuato su 9 cavalli nei quali è stata riprodotta sperimentalmente una condizione di RAO, al fine di misurare le variazioni dell'espressione genica di un vasto profilo di citochine. La ricerca è stata suddivisa in due fasi: induzione e desensibilizzazione.

4.6.1 MATERIALI E METODI

Animali e campionamento

La ricerca, durata complessivamente 20 giorni, ha previsto l'impiego di 9 cavalli, in forza al Centro Militare Veterinario di Grosseto sui quali sono stati effettuati lavaggi broncoalveolari ai seguenti tempi sperimentali: 1° giorno (T1); 3° giorno (T2); 7° giorno (T3); 9° giorno (T4); 11° giorno (T5); 18° giorno (T6).

Il giorno precedente a T1 gli animali sono stati sottoposti ad esame clinico al fine di verificarne la corrispondenza con i criteri di inclusione: cavalli di età superiore ai 10 anni, a fine carriera, allevati all'aperto, con anamnesi remota di RAO e asintomatici. I cavalli sono stati quindi assegnati in modo casuale ai due gruppi sperimentali (gruppo A e gruppo B): il gruppo A in cui è stata indotta sperimentalmente RAO) e il gruppo B (4 cavalli) di controllo (**tab. 1**). L'induzione è stata effettuata stabulando i soggetti in scuderia (**foto 1**), con box singoli (**foto 2**) di circa 3 m per 3 m, alimentati con fieno e mangime, mantenuti su una lettiera in paglia, la quale non è stata rifatta fino al tempo sperimentale T3. Da T1 a T3 i cavalli sono stati lasciati nei rispettivi box e sensibilizzati alle polveri mediante movimentazione manuale di paglia una volta al dì per almeno 15 minuti mantenendo sempre chiuse le finestre del locale.

Il gruppo B invece è stato lasciato all'aperto per tutta la durata dello studio (da T1 a T6) su appezzamenti di terreno recintati adibiti a pascolo (**foto 3**), alimentato con erba integrata da fieno (**foto 4**) e mangime.

Successivamente al BAL fatto a T4 i cavalli del gruppo A sono stati sottoposti ad una fase di desensibilizzazione, procedendo alla sostituzione giornaliera della lettiera con paglia pulita ed alla somministrazione di desametasone (Desashock® 0,25 ml/100 kg IM SID) per due giorni consecutivi. Anche negli animali del gruppo B, mantenuti nelle medesime condizioni iniziali per tutta la durata della ricerca, è stato effettuato tale trattamento farmacologico. Al termine dello studio (T6) tutti i cavalli sono stati messi nuovamente in libertà allo stato semibrado, ripristinando la tipologia di allevamento antecedente lo studio sperimentale.

<i>N° gruppo</i>	<i>Foto</i>	<i>Nome</i>	<i>Matricola</i>	<i>Sesso</i>	<i>Anno</i>	<i>Mantello</i>
1 A		ISOLA BLU	4121	F	1983	Grigio
2 A		BELLE PLATIE	120	F	1989	Sauro
3 A		FIRST FILLY	4009	F	1981	Baio
4 A		ZARA	5313	F	1984	Morello
5 A		LILOMBO	5304	M	1980	Baio
1 B		DON CHISCIOTTE	6046	M	1980	Baio
2 B		MAIRA	4577	F	1981	Sauro scuro
3 B		ULISSE	5352	M	1989	Baio
4 B		LOUDINOT	6066	M	1981	Baio

Tab. 1 Segnalamento dei cavalli utilizzati in corso di sperimentazione



Foto 1 Stabulazione cavalli gruppo A



Foto 2 Box cavalli gruppo A



Foto 3 Sistemazione cavalli gruppo B



Foto 4 Gruppo B, alimentazione (*particolare*)

Esame clinico

Il giorno precedente a T1 su ogni soggetto è stato fatto l'esame clinico, al fine di valutare la presenza di patologie (anche pregresse) che avrebbero potuto interferire con il corretto prelievo dei campioni e con i risultati della ricerca. Dopo l'esame obiettivo generale di ciascun cavallo, sono state approfondite le indagini degli apparati respiratorio e cardiocircolatorio (**tab. 2; tab. 3; tab. 4**).

<i>N° gr</i>	<i>Stato di Nutrizione</i>	<i>Stato del Sensorio</i>	<i>Mucose Apparenti</i>	<i>Linfonodi Esplorabili</i>	<i>T°</i>	<i>G.F.O.</i>
1A	magro	nn	nn	Lieve linfadenomegalia intermascellare	37,6	nn
2A	buono	nn	rosa scuro la buccale/ congesta nasale	Lieve linfadenomegalia intermascellare	37,4	nn
3A	buono	nn	nn	Intermascellari di consistenza dura	37,4	nn
4A	buono	nn	rosa pallido la buccale	Nn	37,8	nn
5A	magro	nn	nn	Nn	37,5	nn
1B	nn	nn	nn	Lieve linfadenomegalia intermascellare	37,6	nn
2B	buono	nn	nn	Nn	37,8	nn
3B	buono	nn	nn	Lieve linfadenomegalia intermascellare	37,6	nn
4B	Discreto	nn	nn	Nn	37,5	nn

Tab. 2 Risultati dell'Esame Obiettivo Generale (nn = nella norma)

<i>N° gr</i>	<i>Aspetto Narici</i>	<i>Riflesso Tosse</i>	<i>Esame funz. Resp.</i>	<i>Freq. Resp.</i>	<i>Dicrotismo Espiratorio</i>	<i>Auscultazione</i>
1A	a tromba	Nn	difficoltà espiratoria	18	+	rantolo
2A	a tromba	facilmente provocabile	difficoltà espiratoria	48	++	sibili diffusi
3A	a tromba	facilmente provocabile	difficoltà inspiratoria	28	++	rantolo
4A	Nn	Nn	nn	32	+	nn
5A	a tromba	Nn	nn	28	++	rantolo
1B	nn	Nn	nn	12	+	rantoli rari
2B	nn	Nn	aumento fase espiratoria	16	+	sibili rari
3B	nn	Nn	nn	20	+	nn
4B	dilatate	Nn	nn	14	+	nn

Tab. 3 Risultati dell'Esame Obiettivo Particolare dell'Apparato Respiratorio (NB nn = nella norma; per la voce *dicrotismo*: '+' modico; '++' marcato)

<i>N° gr</i>	<i>Polso</i>	<i>Freq. Cardiaca</i>	<i>T.R.C.</i>	<i>Auscultazione</i>
1A	nn	36	1	soffio sistolico
2A	leggerm duro	40	2	nn
3A	aritmico	36	1	nn
4A	nn	32	1	sdoppiamento I tono
5A	nn	32	1	soffio sistolico
1B	nn	30	1	sdoppiamento I tono
2B	nn	34	1	nn
3B	nn	39	1	sdoppiamento I tono
4B	nn	32	1	nn

Tab. 4 Risultati dell'Esame Obiettivo Particolare dell'Apparato Cardio Circolatorio

(nn = nella norma)

Lavaggio broncoalveolare

Il lavaggio bronco alveolare (B.A.L.) è stato eseguito previa sedazione di ciascun soggetto con detomidina cloridrato (Domosedan® 0,1 ml/100 kg); il prelievo del campione è stato eseguito mediante un tubo sonda cuffiabile (Cook®), ben lubrificato con lidocaina pomata (Luan®) e inserito in una narice del cavallo sempre in modo da mantenere la testa del cavallo estesa sul collo e favorire così il procedimento della sonda fino all'ingresso in trachea (evidenziato dall'animale con violenti e ripetuti colpi di tosse); da qui, si è continuato a far scorrere il tubo delicatamente per quanto possibile, fino ad arrivare ai lobi polmonari. Indi la sonda è stata cuffiata con insufflazione di 5 cc di aria tramite una siringa da 2,5 ml; a questo punto sono stati immessi tramite sonda nel polmone di ogni cavallo circa 220 ml di soluzione fisiologica a 37°C mediante siringhe da 60 ml. Subito dopo, il liquido di lavaggio è stato riaspirato con altrettante siringhe della stessa capacità e raccolto in becker refrigerato in ghiaccio. Poi la sonda è stata scuffiata, il cavallo è stato stubato e il tubo lavato con acqua.

Questo metodo non prevede l'utilizzo della tecnica endoscopica e quindi non permette di visualizzare il campo polmonare interessato dal campionamento, ma si stima che nel 70% dei casi il lavaggio interessi il lobo diaframmatico del polmone destro.

Stoccaggio

Il fluido di lavaggio broncoalveolare, stoccato in becker (da 200 ml) e pari al 50% della soluzione fisiologica immessa, è stato suddiviso in 2 aliquote in provette apposite (Falcon®) e sottoposto a centrifugazione con centrifuga refrigerata (Eppendorf® 5702 R) a 4°C per 10 minuti a 2000 xg; il surnatante è stato eliminato, e il sedimento rimanente è stato omogenato con una pipetta. Dal pellettato così ottenuto è stata prelevata una quantità pari a 2 gocce per effettuare uno striscio su vetrino, usato per l'esame citomorfologico, e il rimanente è stato sospeso in 2 ml di PBS (soluzione tamponata a pH 7.4), raccolto in provette cryo-vials e sottoposto nuovamente a centrifugazione a 4°C per 10 minuti a 2000 xg. Eliminato il surnatante, il concentrato è stato risospeso in PBS fino al riempimento della provetta, omogenato e stoccato in campana di azoto liquido alla temperatura di circa -196°C. Qui è rimasto per tutta la durata dello studio, al termine del quale, tutti i campioni sono stati trasportati alla facoltà di Medicina Veterinaria di Ozzano dell'Emilia, e conservati alla temperatura di -80°C.

Analisi dei campioni

Esame citomorfologico del BALF

L'indagine citomorfologica ha previsto innanzitutto l'allestimento dei vetrini con striscio a partire dalla sospensione cellulare, ottenuta con la prima centrifugazione a cui è stato sottoposto il BALF (a 4°C per 10 minuti a 2000 xg). Due gocce della suddetta sospensione sono state prelevate dalla provetta (Falcon®) e poste su un vetrino, il quale è stato strisciato mediante apposizione di un altro vetrino con inclinazione a 45 gradi. Successivamente ogni preparato è stato colorato con tecnica Diff-Quick (Bio-Optica® MGG QUICK STAIN). La valutazione ha riguardato le percentuali delle tipologie cellulari (neutrofili, macrofagi, linfociti, eosinofili e macrofagi schiumosi) e la loro concentrazione globale espressa mediante una scala di valori compresa fra 1 (cellularità minima) e 5 (cellularità molto elevata). Accanto è stata riportata la presenza di emosiderofagi, cellule giganti, cellule epiteliali, cristalli di Charcot-Leyden e spirali di Curschmann.

Biologia Molecolare del BALF

Estrazione dell'mRNA

L'RNA totale è stato estratto dai linfociti utilizzando TRI REAGENT (Sigma®, Germania) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Il pellet è stato asciugato all'aria e poi risospeso in 40 µl di RNA secure (Ambion®, USA) diluito in Rnase-free water. Questa soluzione serve per impedire la degradazione dell'RNA e necessita per l'attivazione di un'incubazione per 20 minuti a 60°C dopo lo scongelamento. L'RNA è stato poi conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Trattamento con DNAsi

La retrotrascrizione è avvenuta dopo trattamento con DNAsi in modo da evitare l'amplificazione di materiale genomico di tipo desossiribonucleico come descritto nella sezione *Metodi*.

Retrotrascrizione

Per poter applicare la reazione di PCR allo studio dell'RNA, è necessario che questo venga retrotrascritto in un filamento di DNA complementare (cDNA) fornendo così un appropriato substrato per le polimerasi: questo procedimento si chiama *Trascrizione Inversa* (Reverse Transcription) mediante kit commerciale Takara RNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1.

Polymerase Chain Reaction

La tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ideata da Mullis nel 1985, è una reazione enzimatica *in vitro* che consiste nella sintesi ciclica di DNA, le cui molecole vengono moltiplicate fino a raggiungere un numero molto elevato di copie. Questa polimerizzazione è sequenza-specifica, in quanto solo i tratti di DNA caratterizzati dalla sequenza di interesse alle estremità sono oggetto di sintesi e amplificazione grazie ad un meccanismo di riconoscimento delle estremità della sequenza bersaglio tramite l'appaiamento di queste regioni con oligonucleotidi complementari specifici che guidano la reazione.

Specificità dell'amplificazione e selezione dei primers

Nel nostro lavoro le coppie di primers per ogni citochina sono state in parte tratte dalla letteratura (Giguère e Prescott, 1999) e in parte disegnate mediante il software Oligo (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA), (**tab. 5**) per ottenere frammenti di lunghezza massima di 257 bp per ottimizzare al massimo la resa della PCR quantitativa (Bustin, 2000).

Citochina considerata	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
β actina	ctggcaccacaccttctacaacgag	tcaccggagtccatcacga	214
IL 8	tctcttggccgtcttctctg	ccgttgacgagctttacaa	195
IFN γ	gtgtgcgatttgggttctcta	ttgaatgacctggttatct	235
IL 6	ctgccctgaaaaatgagatgtga	actcgttctggagggtactc	204
TNF α	agctctctctgggcacctac	tgggggttcggaggggtgttac	205
IL 1 β	gaggcagccatggcagcagta	tgtgagcaggggaacgggtatctt	257

Tab. 5 Disegno dei *primers*

Per testare l'efficacia dei primers è stato raccolto il sangue in vacutainer con EDTA da cavalli adulti sani. Le cellule periferiche mononucleate (PBMCs) sono state separate mediante gradiente di densità di centrifugazione usando il composto privo di tossine Ficoll-Paque (gravità specifica 1.077, Pharmacia Biotech, Quebec, Canada) e lavate con soluzione fosfato salina (PBS). Tale metodica impedisce che durante le manualità di prelevamento del buffy coat permangano dei residui di globuli rossi che contenendo emoglobina vadano ad inficiare la funzionalità dell'enzima di amplificazione Taq polimerasi.

Queste sono state diluite fino a raggiungere la concentrazione di 5×10^6 cellule per ml e messe in piastra in RPMI 1640 medium (Gibco BRL Burlington, Ont., Canada) contenente il 10 % di siero fetale bovino (Gibco BRL) supplementato con streptomicina, penicillina G e furazolidone ad una concentrazione di 100mg/ml rispettivamente. Per catalizzare le reazioni mitotiche fra le PBMCs è stata addizionata della Concanavalina A (ConA) alla sospensione cellulare ad una concentrazione di 10 mg/ml. Quindi un volume di 2 ml di sospensione cellulare è stata posta ad incubare per 24 e 48 ore a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Come controllo sono state poste in coltura anche delle cellule senza aggiungere concanavalina alle stesse condizioni.

In ciascuna mix di reazione sono contenuti i reagenti elencati in **tabella 6** per un totale di reazione dopo aggiunta di 5 µl di cDNA di 50 µl e sottoposti a cicli di amplificazione come elencato nella **tabella 7** con temperature di annealing per l'appaiamento dei primer diverse a seconda del gene target considerato.

Componenti	Volume/reazione	Concentrazione Finale
10x QIAGEN PCR Buffer	5 µl	1x
5x Q-solution	10 µl	1x
dNTP mix (10mM each)	4 µl	250 µM of each dNTP
Primer A	1	0,4 µM
Primer B	1	0,4 µM
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	2,5 units/reaction
Acqua distillata	23,75	
Templato DNA	5 DNA	≤ 1 µg/reaction
Volume Totale	50 µl	

Tabella 6 Componenti reazione di amplificazione con kit Qiagen

	Temperatura (°C)	Tempo per ciclo	N° cicli
Inattivazione dell'Rtasi e denaturazione iniziale	94°C	2 min	1 ciclo
Denaturazione	94°C	20 sec	40 cicli
Appaiamento dei primers	58°C TNF-α	30 sec	
	55°C IL-6; IL-8; IFN γ		
Estensione del filamento di DNA	72°C	1 min	
Estensione finale	72°C	5 min	1 ciclo

Tab. 7 Procedura per la reazione di amplificazione

Purificazione e clonazione di frammenti

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro utilizzando un marker 100 bp di DNA standard (N3231S, Biolabs, New England, UK) per determinare le dimensioni delle bande. I prodotti purificati per ogni citochina sono stati clonati in un plasmide e trasformati in *E. Coli* TOP 10 (Topo TA Cloning, Invitrogen) purificandoli successivamente con Turbo Kit (QBIogene).

I plasmidi ricombinanti sono stati linearizzati mediante taglio a carico di una sequenza target usando l'enzima di restrizione endonuclease *PmeI* (Fermentas) per evitare la presenza di superavvolgimenti e per stimolare più efficacemente l'amplificazione del materiale genomico. Di tali plasmidi ricombinanti sono state effettuate delle diluizioni in base 10 da 10^9 copie a 10^1 copie per tracciare la curva standard di riferimento; di queste almeno 6 diluizioni sono state incluse in ogni Real Time PCR e da tali punti si sono interpolate le concentrazioni della singola citochina in base alla fluorescenza emessa dai campioni (Bustin, 2000, Overbergh *et al*, 2003).

Real Time PCR

La *Real-Time PCR* è una metodica che permette di visualizzare l'andamento della reazione di amplificazione già dalle sue prime fasi, ottenendo una stima quantitativa del prodotto di PCR che si sta formando in contemporanea allo svolgersi della reazione, cioè in tempo reale ("real time"). Per la descrizione della metodica si rimanda al capitolo **3 Metodi**.

ANALISI STATISTICA

I risultati della quantificazione dell'espressione genica delle 5 citochine sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni statistiche:

confronto tra i valori iniziali T1 ed i valori misurati nei successivi tempi sperimentali, media tra T test per dati appaiati;

confronto, in ciascun tempo sperimentale, tra i valori del gruppo A e quelli del gruppo B, media tra Mann-Whitney test

L'analisi statistica è stata effettuata con il software informatico GraphPad Prism 4.00 per Windows, GraphPad software, S Diego, California, USA.

Il livello di significatività è stato posto inferiore a 0,05.

4.6.3 RISULTATI

Il modello sperimentale si è rivelato efficace in quanto tutti i soggetti del gruppo A hanno manifestato nel corso della fase di induzione (T1-T4) una chiara sintomatologia riferibile a RAO. Tali dati semiologici hanno peraltro trovato puntuale riscontro all'esame citologico del BAL e della quantificazione dell'espressione citochinica.

Risultati esame clinico

Già dopo 2-4 giorni dall'inizio della prova l'esame clinico ha evidenziato la comparsa di tosse ad accessi, dispnea con accentuazione del rictus respiratorio in tutti i soggetti del gruppo A. Tale sintomatologia respiratoria ha assunto gravità particolare in 2 soggetti (2A e 3A), i quali hanno presentato anche scolo nasale (**foto 5; foto 6**) monolaterale di tipo siero-mucoso. In nessun soggetto del gruppo B si sono registrate modificazioni del quadro clinico.



Foto 5 Scolo nasale, cavallo 2A

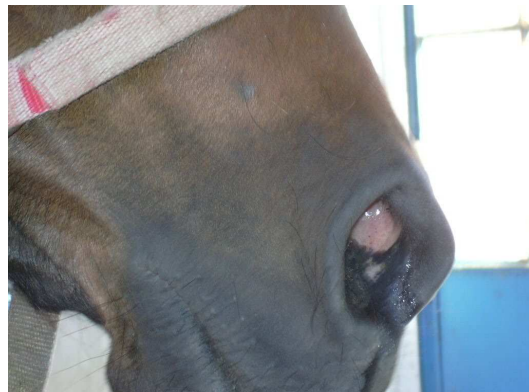


Foto 6 Scolo nasale, cavallo 3A

Risultati esame citologico dei BALF

Anche l'esame del BALF ha mostrato con chiarezza il diverso comportamento tra i due gruppi sia per quanto concerne la cellularità dei campioni che la tipologia delle cellule analizzate. Infatti come illustrato dai grafici (**grafico 1; 2**) nel gruppo A la quantità di cellule è aumentata in maniera pressoché costante nel corso dell'intero periodo, mentre nei soggetti di controllo essa ha subito modificazioni sensibili soltanto nella fase finale, che risulta comunque preceduta da un decremento prolungato.

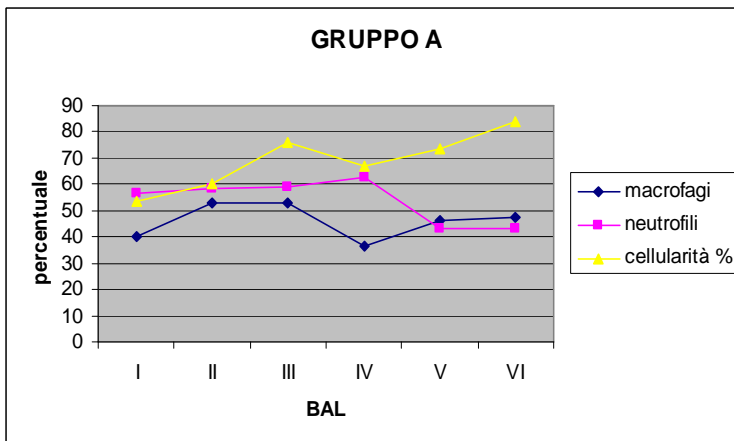


Grafico 1 Gruppo A: variazioni cellulari

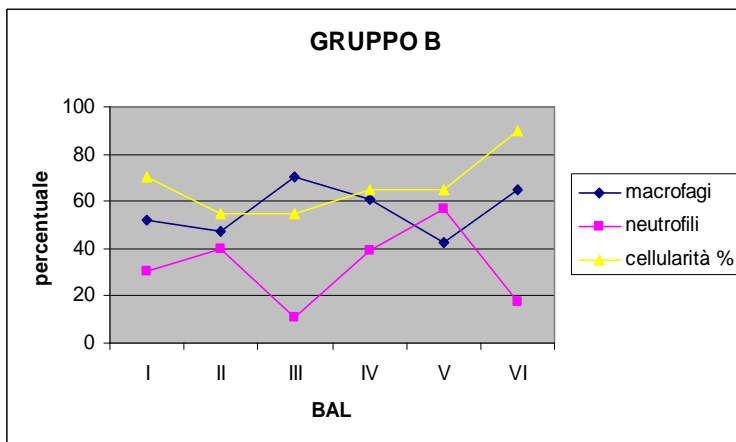




Grafico 2 Gruppo B: variazioni cellulari


Riguardo alla tipologia cellulare, nel gruppo A si è assistito, dopo l'induzione, al tipico incremento dei neutrofili; il fenomeno invece non è avvenuto nel gruppo di controllo, i cui soggetti hanno mostrato una sostanziale diminuzione percentuale di queste cellule, come si può ben apprezzare dalle valutazioni di ogni singolo cavallo (**tabelle 8, 9, 10, 11, 12; 13; 14; 15; 16**).

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	40	16	34	26	62	20
LINFOCITI			2		1	
NEUTROFILI	48	78	61	74	33	80
EOSINOFILI		2				
MACROF. SCHIUMOSI	2		3			
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	4	5	5	4	4	5
ALTRO	spiralidi Curshmann. 8% emosiderofagi	6% emosiderofagi. Molto muco	molto muco	spiralidi Curshmann	4% emosiderofagi. Molte cellule giganti	

Tab. 8 Risultati citologici cavallo 1A

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	22	29	19	32	8	38
LINFOCITI	3		1			2
NEUTROFILI	75	71	80	68	92	58
EOSINOFILI						
MACROF. SCHIUMOSI						
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	3	4	4	5	5	3
ALTRO	cristalli di Charcot-Leyden	Cellule rovinate. Problemi coloraz. Spirali lunghe	cristalli di Charcot-Leyden	cristalli di Charcot-Leyden		2% emosiderofagi.


Tab. 9 Risultati citologici cavallo 2A

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	44	60	66	28	8	30
LINFOCITI	1		4	2		
NEUTROFILI	55	40	30	70	92	70
EOSINOFILI						
MACROF. SCHIUMOSI						
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	3	4	4	4	5	4
ALTRO	spirali di Curshmann		spirali di Curshmann			

Tab. 10 Risultati citologici cavallo 3A

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	74	70	50	27	73	69
LINFOCITI	2	1			2	
NEUTROFILI	13	29	50	70	23	31
EOSINOFILI						
MACROF. SCHIUMOSI	11					
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	2	1	2	4	5	5
ALTRO		molto muco	cellule rovinate. Problemi colorazione	3% emosiderofagi	2% emosiderofagi	cellule epiteliali


Tab. 11 Risultati citologici cavallo 4A

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	22	89	97	70	81	80
LINFOCITI		1	1			1
NEUTROFILI	75	10	2	30	19	19
EOSINOFILI	1					
MACROF. SCHIUMOSI						
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	4	1	4	3	3	5
ALTRO	2% emosiderofagi		cristalli di Charcot-Leyden. Ammassi di macrofagi	cellule rovinate. Problemi coloraz	cristalli di Charcot-Leyden. Molte cellule giganti	


Tab. 12 Risultati citologici cavallo 5A

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL non pervenuto	VI BAL
MACROFAGI	8	77	95	33		70
LINFOCITI						
NEUTROFILI	81	23	5	67		30
EOSINOFILI	3					
MACROF. SCHIUMOSI						
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	5	2	2	2		4
ALTRO	cristalli di Charcot-Leyden. 8% emosiderofagi	qualche cellula ciliata	cellule rovinate. Problemi colorazione	cristalli di Charcot-Leyden. Problemi colorazione		scarsa colorazione


Tab. 13 Risultati citologici cavallo 1B

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	85	50	95	81	37	90
LINFOCITI				1		1
NEUTROFILI	15	49	3	18	60	8
EOSINOFILI		1	1			1
MACROF. SCHIUMOSI			1		3	
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	3	3	3	3	4	4
ALTRO			molto muco	1 cellula gigante		

Tab. 14 Risultati citologici cavallo 2B

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	70	88	98	64	70	82
LINFOCITI						2
NEUTROFILI	24	12	1	36	30	16
EOSINOFILI	2		1			
MACROF. SCHIUMOSI	2					
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	4	3	2	4	4	5
ALTRO	2% emosiderofagi	cellule rovinate. Problemi coloraz.	molto muco. Poco colorato. Cellule epiteliali squamose		cristalli di Charcot-Leyden. Cellule rovinate	qualche cellula gigante

Tab. 15 Risultati citologici cavallo 3B

	I BAL	II BAL	III BAL	IV BAL	V BAL	VI BAL
MACROFAGI	98	22	64	64	20	82
LINFOCITI						2
NEUTROFILI	2	77	35	36	80	16
EOSINOFILI						
MACROF. SCHIUMOSI		1	1			
CELLULARITA' (valutata da 1 a 5)	2	3	2	4	5	5
ALTRO			numerosi cristalli di Charcot- Leyden	presenza eosinofili	numerosi cristalli di Charcot- Leyden	

Tab. 16 Risultati citologici cavallo 4B

Risultati della Real Time PCR

Tutti i frammenti amplificati sono risultati della lunghezza attesa. I livelli di espressione per ogni singolo gene target sono stati espressi come rapporto fra la citochina considerata e la β -actina (gene housekeeping) (Fig 17 e Fig 18).

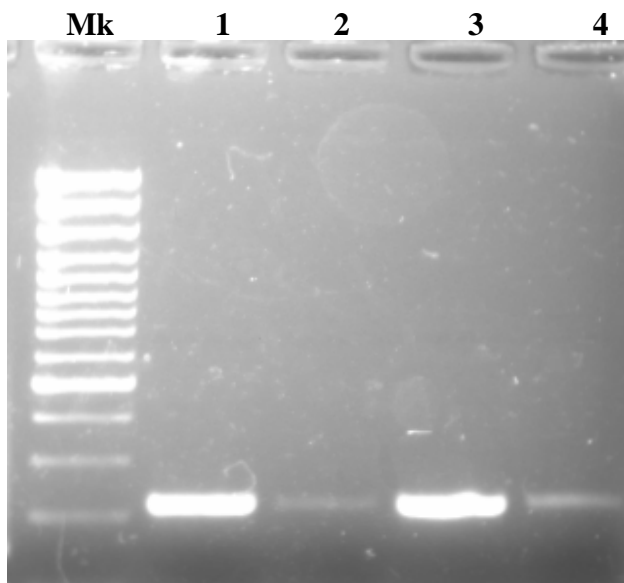


Figura 17 Corsa elettroforetica per il frammento amplificato di β -actina (214 bp) retroscritto con 2 diverse metodiche mente Oligo d(t) o Random Hexamers in diversi tempi dopo stimolazione con Concanavalina A

Mk: marker NS2331

1: cDNA mediante Random Hexamers a 12 ore

2: cDNA mediante Random Hexamers a 24 ore

3: cDNA mediante Oligo d(T) a 12 ore

4: cDNA mediante Oligo d(T) a 24 ore

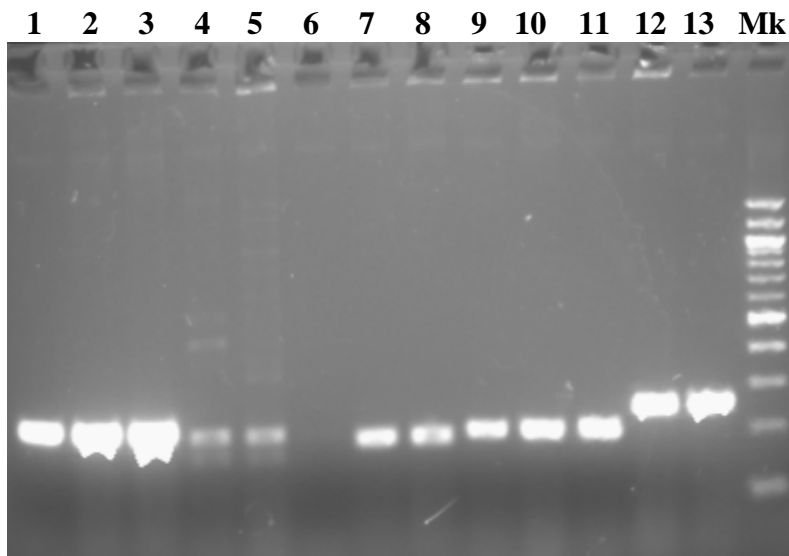


Figura 18

Conferma dell'avvenuto inserimento del frammento codificante per i differenti geni target all'interno del plasmide costituito da Coli mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%.

lane 1, 2, 3: β -actina (214 bp)

lane 4, 5: IL 6 (204 bp)

lane 6: mancato inserimento del frammento codificante per IL 6

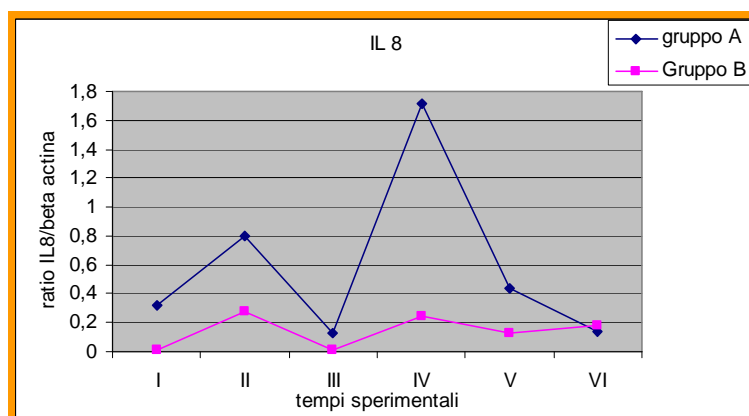
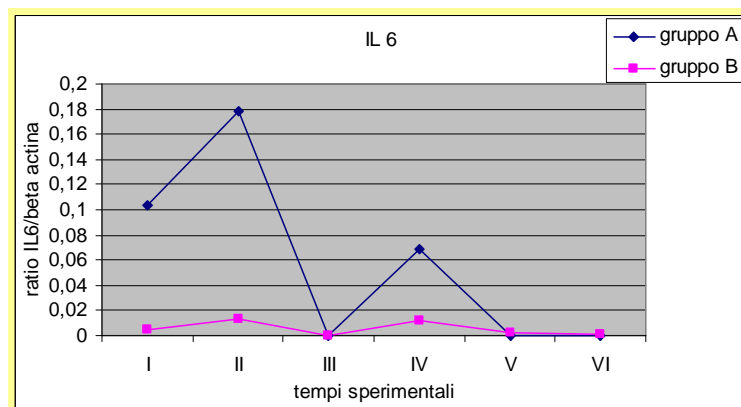
lane 7, 8: IL 8 (195 bp)

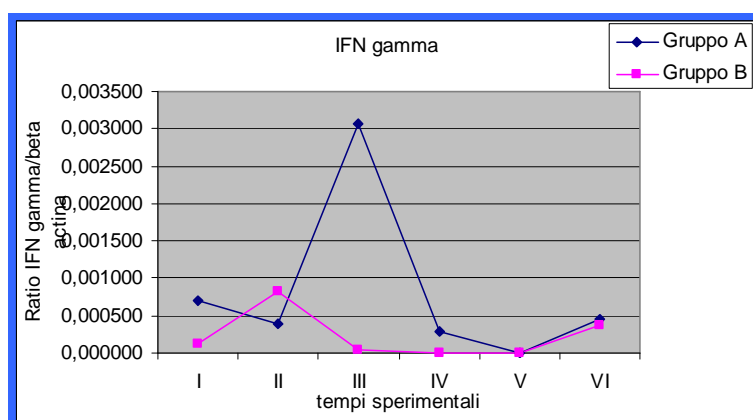
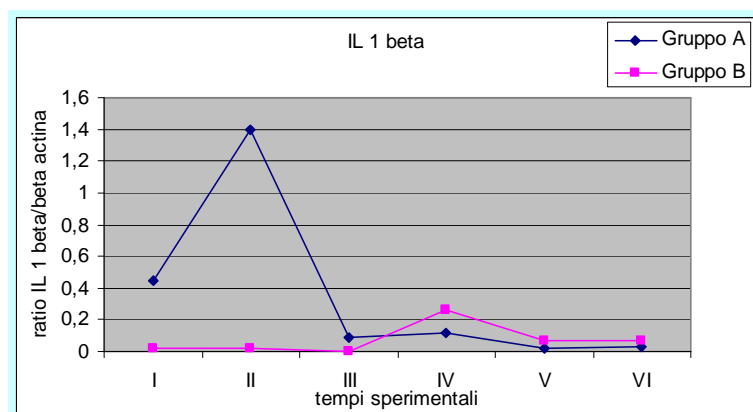
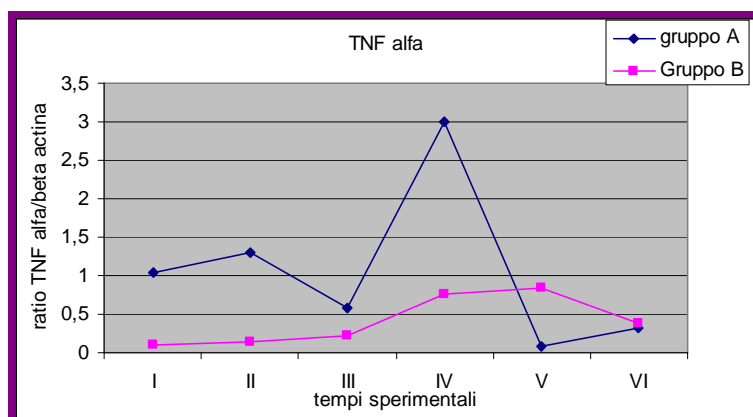
lane 9, 10, 11: TNF alfa (205 bp)

lane 12, 13: IL 1 beta (257 bp)

Mk: Marker

I risultati analitici dell'espressione genica di ciascuna citochina sono riportati nei seguenti grafici (Grafici 3, 4, 5, 6 e 7):





Grafici 3, 4, 5, 6 e 7 Espressione genica per le diverse citochine considerate nei vari tempi sperimentali

Il primo dato da evidenziare è relativo alla sostanziale omogeneità dei valori di partenza (T1) osservato nei due gruppi sperimentali, se si eccettuano le differenze riscontrate per IL-6 ($P < 0,05$). Tali valori di partenza si sono mantenuti sostanzialmente invariati nel gruppo B, mentre nel gruppo A si sono registrate, in tempi diversi, modificazioni notevoli dei livelli di espressione di tutte le citochine esaminate. In particolare dopo l'induzione si è registrato un picco precoce (a T2) di IL-6 e IL-1 β , seguito da una netta diminuzione dei valori per entrambi i geni target a T3 che, per IL-6 ha assunto anche carattere di significatività statistica.

A T3 è dato osservare un secondo picco, quello del γ -IFN, i cui livelli di espressione, sempre nel gruppo A, si discountano significativamente da quelli del gruppo di controllo ($P < 0,01$).

Una cronologia diversa è da osservarsi riguardo al numero di copie rilevate per TNF- α e IL-8, per le quali il picco di massima espressione avviene più tardivamente (T4), significativo per IL-8.

E' interessante considerare inoltre come il crollo manifestato da IL-6, TNF- α , IL-8 e IL-1 β a T3 avvenga in coincidenza con l'aumento del γ -IFN. Il comportamento di quest'ultimo appare infatti "complementare" rispetto alle altre quattro citochine considerate, mantenendosi in tutti gli altri tempi sperimentali a valori basali.

Infine è degno di nota il crollo nell'espressione genica di tutte e cinque le citochine considerate nella fase di desensibilizzazione.

4.6.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La metodica analitica si è rivelata atta a quantificare l'espressione genica di tutte le citochine prese in esame.

Dall'esame dell'andamento dei profili citochinici evidenziati nel gruppo A (**Grafico 8**) è evidente la sequenza di attivazione di tutte e cinque le citochine prese in considerazione nella presente ricerca. La loro cinetica complessiva e la cronologia degli eventi suggeriscono alcune interessanti considerazioni sugli eventi a cascata che sembrano verificarsi nell'attivazione cellulare.

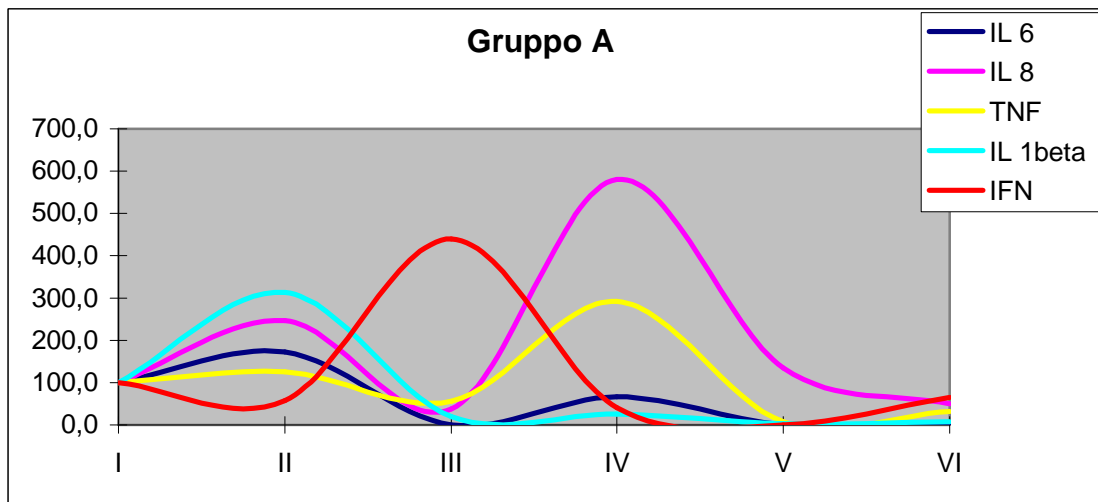


Grafico 8 Variazioni dei profili citochinici in soggetti con RAO sperimentalmente indotta

Il primo evento chiave si identifica nel fatto che nelle fasi iniziali della patologia sono soltanto le molecole pro-infiammatorie (IL-6 e IL-1 β) a manifestare una up-regulation, il cui effetto complessivo, può essere messo in relazione alla stimolazione dei macrofagi ed all'attivazione linfocitaria. A questa fase, subentra una up-regulation del γ -IFN contestuale alla down-regulation delle citochine pro-infiammatorie.

Quest'aumento del γ -IFN rappresenta certamente un evento critico poiché testimonia che nelle fasi intermedie della RAO avviene una polarizzazione della risposta immunitaria verso la tipologia Th1 mediata.

Nelle fasi più avanzate della patologia, ed in corrispondenza con l'acme sintomatologico, si assiste ad un nuovo riassetto immunologico, sottolineato dalla scomparsa dell'azione IFN-mediata e dalla presenza contemporanea dei picchi di espressione di IL-8 e TNF- α . Tale fenomeno assume particolare significato immunopatologico, stante la sinergia d'azione fra le due citochine nel reclutamento e nell'attivazione dei neutrofili (Joubert et. al 2001), visibile in modo chiaro anche da un punto di vista citologico (**foto 19**).

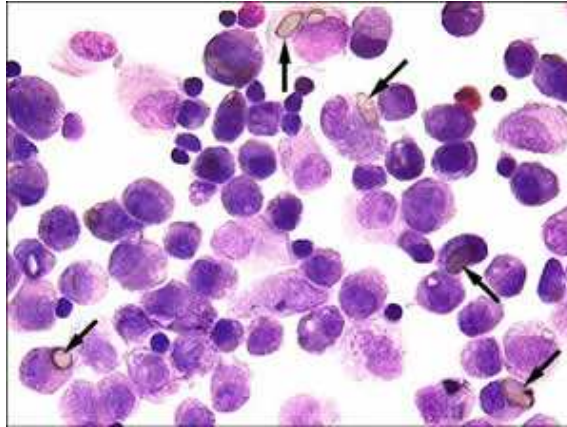


Foto 19 Neutrofilia e spore nel BALF di cavallo con RAO in fase acuta

Infine risulta degna di nota la risposta registrata nei soggetti del gruppo A. In questi animali, infatti, a seguito dell'inizio della fase di desensibilizzazione, è stato osservato non solo un netto e rapido ripristino delle condizioni cliniche ma anche il contestuale decremento dell'espressione genica di tutte le citochine considerate. (Robinson *et al.*, 2001; Rush *et al.*, 1998).

Alla luce delle attuali conoscenze in materia, si ritiene che l'evento caratterizzante evidenziato dai risultati ottenuti, sia rappresentato dal fatto che γ -IFN da un lato (risposta Th1) e IL-6 dall'altro (risposta Th2) hanno manifestato un comportamento sorprendentemente speculare, tanto da far ipotizzare molto ragionevolmente un'alternanza di ruolo delle sottopopolazioni linfocitarie di cui sono rispettivamente stimolo ed espressione. Ciò è rafforzato anche dal comportamento manifestato dalle altre citochine (IL-8, IL-1 β e TNF- α) prodotte da uno stimolo a carico dei Th2 (Cordeau *et al.*, 2004; Lavoie *et al.*, 2001). Ad esse è da attribuire l'innesco di un'attivazione Th2 mediata dei linfociti B. Queste considerazioni appaiono per altro in accordo con le ipotesi patogenetiche espresse da alcuni Autori circa l'interazione fra le due sottopopolazioni di linfociti Th1 e Th2 quale fattore caratterizzante gli eventi immunopatologici alla base della RAO (Kleiber *et al.*, 2005; Bowles *et al.*, 2002; Beadle *et al.*, 2002). A tal riguardo, è da rilevare come altri Autori sostengano, invece, l'intervento di una risposta predominante di tipo Th1 (Ainsworth *et al.*, 2003) o Th2 (Lavoie *et al.*, 2001).

In conclusione, i risultati della presente ricerca supportano fortemente l'ipotesi che in corso di RAO non ci sia uno *switch* isotipico Th1:Th2 ma piuttosto che le popolazioni Th1 e Th2 siano stimulate in modo non sincrono in tempi diversi.

4.7 Sperimentazione 7

Valutazione di marker in corso di setticemia dei puledri

4.7.1 INTRODUZIONE

Le infiammazioni sistemiche di origine batterica continuano tutt'oggi ad essere una delle principali cause di mortalità e morbilità nei puledri (Cohen, 1994).

La possibilità di diagnosticare in tempi utili una setticemia nel puledro, nonostante vengano effettuate delle valutazioni laboratoristiche e cliniche su larga scala, risulta alquanto difficoltosa. La definitiva diagnosi di setticemia si ha solo nel momento in cui si ha una emocoltura positiva che, oltre a richiedere un minimo di 48 ore per essere effettuata, presenta una sensibilità alle volte decisamente poco soddisfacente (12%) e non sempre è disponibile (Paradis, 1994).

Studi precedenti hanno esaminato i parametri laboratoristici in corso di sepsi. Rimane comunque da chiarire quali siano veramente i parametri attendibili e prognostici per definire la setticemia dei neonati.

Il tentativo di inquadrare rilevamenti clinici e laboratoristici ha portato ad inquadrarli nel sepsi score, un punteggio attribuito per stabilire una valutazione (Brewer *et* Koterba, 1988; Brewer *et al.*, 1988).



La sensibilità e la specificità di tale metodica sono stati riportati essere rispettivamente del 93% ed 86%. In realtà tale rilievo assume poco significato dal momento che parametri totalmente diversi vengono conglobati in un unico parametro di tipo numerico.

Il rischio può essere infatti quello di perdere l'attenzione su un parametro particolarmente critico al fine della terapia e conseguente fatale. Un'altra limitazione nasce dal fatto che i meccanismi patofisiologici nei puledri neonati con sindrome da infiammazione sistemica sono consistenti (Paradis, 1994).

Negli ultimi anni molti lavori scientifici hanno cercato di individuare marker di sepsi attendibili da utilizzarsi nella diagnosi di sepsi neonatale (Stoneham *et al.*, 2001; Hulten *et* Demmers, 2002).

Nonostante questi marker siano altamente sensibili e specifici, essi richiedono kit complicati o analisi che necessitano tempo. L'espressione genica di mediatori di flogosi nel sangue nei neonati umani è in corso di indagine tuttora. L'espressione di RNA messaggero codificante per le citochine nel sangue del cordone ombelicale è stata utilizzata quale marker per sepsi e virulenza batterica. Pochi sono i lavori che hanno coinvolto la valutazione di citochine in corso di puledri neonati in sepsi. Il proposito di questo lavoro è stato di determinare l'espressione genica di alcune citochine coinvolte nel fenomeno di flogosi nel sangue di puledri nati presso il Dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna.

4.7.2 MATERIALI E METODI

Selezione dei casi

Un numero di 31 puledri afferenti alla sezione di Ostetricia del Dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Bologna nella stagione di parto dell'anno 2006 e 2007 hanno costituito il gruppo di indagine per questo studio.

Tutti i puledri avevano un'età inferiore ai 7 giorni. Utilizzando parametri clini, laboratoristici e anamnestici per ogni puledro è stato calcolato un punteggio di sepsi score. Sulla base

dell'emocultura e di tale sepsi score i puledri sono stati assegnati a 2 gruppi di pazienti: un gruppo di puledri sani (18 soggetti) e un gruppo di malati settici (13 soggetti).

I settici erano rappresentati da soggetti con sepsi score inferiore a 11 con emocoltura positiva mentre il gruppo dei sani presentava un sepsi score superiore a 11.

I prelievi di sangue sono iniziati alla nascita (T 0), pertanto prima di partire con qualsiasi trattamento terapeutico e durante il trattamento antibiotico a 24 e 72 ore (T 24 e T 72) per valutare l'andamento dell'espressione citochinica. Oltre a questi siamo andati a valutare anche i parametri ematobiochimici dei puledri appartenenti ai diversi gruppi alla nascita per valutare eventuali correlazioni positive che però non saranno oggetto di tale tesi.

Prelievi di sangue

I prelievi di sangue da ogni singolo puledro sono stati effettuati alla nascita (T 0) e dopo 24 e 72 ore (T 24 e T 72 rispettivamente).

Dal sangue sono state isolate le cellule periferiche mononucleate (PBMCs) mediante gradiente di densità di centrifugazione usando il composto privo di tossine Ficoll-Paque (gravità specifica 1.077, Pharmacia Biotech, Quebec, Canada (**figura a lato**)) e lavate con soluzione fosfato salina (PBS). Tale metodica impedisce che durante le manualità di prelievo del *buffy coat* permangano dei residui di globuli rossi che contenendo emoglobina vadano ad inficiare la funzionalità dell'enzima di amplificazione Taq polimerasi.



Trattamento con DNAsi

La retrotrascrizione è avvenuta dopo trattamento con DNAsi in modo da evitare l'amplificazione di materiale genomico di tipo desossiribonucleico come descritto nella sezione **Metodi**.

Retrotrascrizione

Per poter applicare la reazione di PCR allo studio dell'RNA, è necessario che questo venga retrotrascritto in un filamento di DNA complementare (cDNA) fornendo così un appropriato substrato per le polimerasi: questo procedimento si chiama *Trascrizione Inversa* (Reverse Transcription) mediante kit commerciale Takara RNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1.

Polymerase Chain Reaction

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR), reazione enzimatica *in vitro* che consiste nella sintesi ciclica di DNA, le cui molecole vengono moltiplicate fino a raggiungere un numero molto elevato di copie. Questa polimerizzazione è sequenza-specifica, in quanto solo i tratti di DNA caratterizzati dalla sequenza di interesse alle estremità sono oggetto di sintesi e amplificazione grazie ad un meccanismo di riconoscimento delle estremità della sequenza bersaglio tramite l'appaiamento di queste regioni con oligonucleotidi complementari specifici (*primers*) che guidano la reazione.

Specificità dell'amplificazione e selezione dei primers

Nel nostro lavoro le coppie di primers per ogni citochina sono state in parte tratte dalla letteratura (Giguère e Prescott, 1999) e in parte disegnate mediante il software Oligo (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA), (**tab. 1**) per ottenere frammenti di lunghezza massima di 257 bp per ottimizzare al massimo la resa della PCR quantitativa (Bustin, 2000).

Target Gene	Primers forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
β actina	CTGGCACCACACCTTCTACAACGAG	TCACCGGAGTCCATCACGA	214
IL 8	TCTCTTGGCCGTCTTCCTG	CCGTTGACGAGCTTTACAA	195
IFN γ	GTGTGCGATTTTGGGTTCTTCTA	TTGAATGACCTGGTTATCT	235
TNF α	AGCTCTCCTGGGCACCTAC	TGGGGTTCGGAGGGGTGTTAC	205
IL 1 β	GAGGCAGCCATGGCAGCAGTA	TGTGAGCAGGGAACGGGTATCTT	257

Tabella 1 Primer utilizzati per le reazioni di Polymerase Chain Reaction

Purificazione e clonazione di frammenti

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro utilizzando un marker 100 bp di DNA standard (N3231S, Biolabs, New England, UK) per determinare le dimensioni delle bande. I prodotti purificati per ogni citochina sono stati clonati in un plasmide e trasformati in *E. Coli* TOP 10 (Topo TA Cloning, Invitrogen) purificandoli successivamente con Turbo Kit (QBIogene).

I plasmidi ricombinanti sono stati linearizzati mediante taglio a carico di una sequenza target usando l'enzima di restrizione endonuclease *PmeI* (Fermentas) per evitare la presenza di superavvolgimenti e per stimolare più efficacemente l'amplificazione del materiale genomico. Di tali plasmidi ricombinanti sono state effettuate delle diluizioni in base 10 da 10^9 copie a 10^1 copie per tracciare la curva standard di riferimento; di queste almeno 6 diluizioni sono state incluse in ogni Real Time PCR e da tali punti si sono interpolate le concentrazioni della singola citochina in base alla fluorescenza emessa dai campioni (Bustin, 2000, Overbergh *et al*, 2003).

Real Time PCR

I prodotti di PCR purificati per ogni citochina e per il genoma virale sono stati clonati in un plasmide, trasformati in *E. Coli* TOP 10 con Topo TA Cloning (Invitrogen, USA) e purificati con Turbo Kit (QBIogene, USA). I plasmidi ottenuti sono stati linearizzati tramite l'uso di enzimi di restrizione e diluiti in base 10 per tracciare la curva standard di riferimento. Almeno 6 diluizioni sono state incluse in ogni real time PCR per calcolare le concentrazioni delle citochine. Il valore assoluto ottenuto è stato rapportato al valore assoluto del gene housekeeper al fine di normalizzare tali quantità esprimendoli graficamente secondo una scala logaritmica (**Fig. 3**) (Bustin, 2000).

Le reazioni di real time PCR sono state condotte con Rotor-Gene 3000 System (Corbett Research, Australia). Le amplificazioni sono avvenute in un volume totale di 25 μ l contenente 1X di SYBR PREMIX Ex Taq (Takara, Giappone) 200 nM per ogni primer, 1X di Rox References Dye e 2 μ l di cDNA. I parametri di ogni ciclo sono stati i seguenti: 10 minuti a 95°C di denaturazione iniziale seguiti da 40 cicli di 15 secondi a 95°C, 15 secondi di annealing (IFN γ 54°C, IL-8 55°C, GADPH 56°C,) 20 secondi a 72°C. Il segnale di emissione della fluorescenza è stato rilevato sul canale FAM (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) alla fine della fase di estensione (vedi capitolo **Metodi**).

Per differenziare i prodotti specifici dai non specifici e dai primer dimers, è stata tracciata una curva di melting dopo l'amplificazione mantenendo la temperatura a 72°C per 12 secondi

seguiti da graduali aumenti di 0,1°C/secondo fino a raggiungere i 95°C, con l'acquisizione della fluorescenza in ogni step sul FAM channel (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5). I risultati sono stati espressi come numero di copie di gene target ogni 1000 copie di housekeeping.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con il software informatico GraphPad Prism 4.00 per Windows, GraphPad software, S Diego, California, USA con test One Way ANOVA paragonando i due gruppi nei diversi tempi sperimentali per dati non parametrici seguito da test di Mann Whitney U. Il livello di significatività è stato posto inferiore a 0,05.

4.7.3 RISULTATI

L'espressione citochinica per quanto riguarda i due gruppi nei due differenti tempi sperimentali ha messo in evidenza come, con il passare delle ore dalla nascita i soggetti classificati come settici hanno mostrato una differenza statistica sempre meno rilevante rispetto al gruppo dei sani per quanto concerne l'espressione di IL 1beta e IL 8. Questo era accompagnato ad un miglioramento delle condizioni cliniche dei puledri.

Inoltre si è evidenziato come i puledri, indipendentemente dallo stato clinico o dalla NOXA responsabile della patologia, non siano in grado di esprimere IFN γ ; tale dato è supportato da lavori pubblicati di recente dove si evidenzia l'assenza di tale mediatore infiammatorio capace di indirizzare la risposta immunitaria verso una risposta cellulo mediata con conseguente maggior predisposizione di questi verso l'infezioni di organismi intracellulari quali *Rhodococcus equi*.

L'espressione di TNF α è stata rilevata solamente nel soggetto deceduto mentre negli altri soggetti non è stato possibile rilevarne la presenza (dati non mostrati).

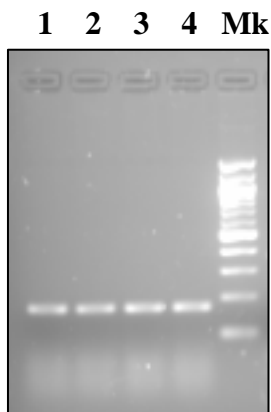


Fig 2. Gel agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. In tutte le lane considerate si mette in evidenza la presenza di amplificato codificante per IL 8 all'altezza di 195 bp.

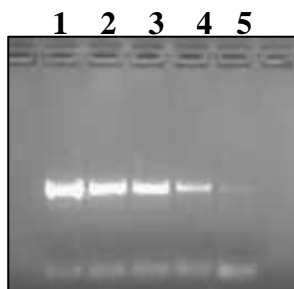
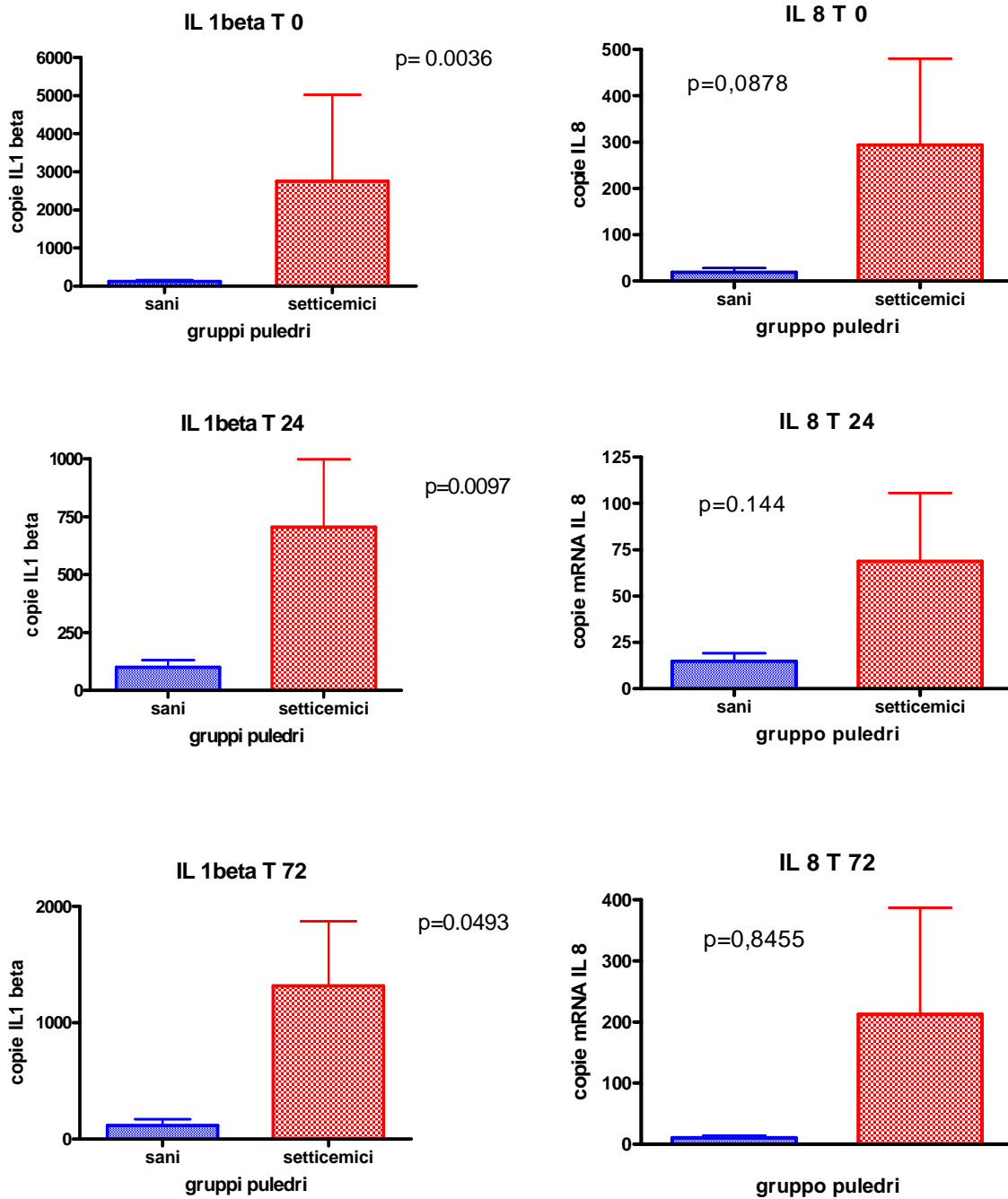


Fig 3. Gel agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. Plasmidi codificanti per il gene dell'IL1 β amplificati in corso di Real time PCR per ottenere la retta di riferimento sulla quale estrapolare la concentrazione di citochina in campioni a concentrazioni ignote. Si nota la maggior intensità corrispondente ad un maggior quantitativo di amplificato. Le quantità di plasmide sono diluite in base logaritmica dalla lane 1 alla lane 5.



Grafici 1 Espressione di IL 1β e IL 8 nei gruppi di puledri settici e sani nei tre tempi sperimentali considerati T 0, T 24 e T 72.

4.7.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La sepsi neonatale è una sequela di eventi che può portare a morte i puledri. Vi sono notevoli studi riguardo il coinvolgimento dell'azione di numerose citochine infiammatorie nel processo flogistico (Maar, 2004). Le citochine pro infiammatorie che si vengono a liberare durante il processo flogistico sono bilanciate dalla produzione di citochine antinfiammatorie con l'obiettivo di limitare i danni ai tessuti circostanti indotte dalle prime. Questa risposta antinfiammatoria, riportata come sindrome da risposta antinfiammatoria, ristabilisce un'omeostasi che se non viene raggiunta determina uno stato infiammatorio di disfunzione organica sistemica (Bone *et al.*, 1997).

La valutazione dell'espressione genica di marker biologici è stata adottata negli ultimi anni come approccio per investigare il complesso meccanismo alla base delle infezioni neonatali, valutando la presenza di eventuali indicatori prognostici e diagnostici (Berner *et al.*, 2000, 2001).

Nel presente studio siamo andati a valutare l'espressione di alcune citochine coinvolte su più fronti del sistema immunitario.

Il Tumor Necrosis Factor α (TNF α) è prodotto prevalentemente da linfociti T CD4⁺ oltre che da macrofagi e neutrofili. Nelle fase precoci della sepsi si è visto che tale mediatore ha un aspetto predominante aumentando in maniera rapida e altrettanto rapidamente ritornando a livelli basali (Wu *et al.*, 2002). In alcuni casi si ha addirittura un decremento di tale mediatore dovuto all'intervento di mediatori ad attività antinfiammatoria quali IL 10. Tale azione esercitata dall'interleuchina 10 pare sia esercitata a livello genico nei macrofagi in particolare, determinando un decremento a livello proteico di questa (Wang *et al.*, 1994).

Nel nostro caso, a differenza di quanto riportato da altri autori (Pusterla *et al.*, 2006), il TNF alfa è stato rilevato solo nel soggetto poi deceduto mentre negli altri non si è rivelata espressione di tale mediatore proinfiammatorio. Questo probabilmente dovuto allo scatenarsi di una risposta infiammatoria non compensata da adeguato effetto della componente antinfiammatoria determinando quindi un coinvolgimento sistemico fino alla morte.

Data la limitata casistica ovviamente tale rilievo di tipo laboratoristico non può attribuire al TNF alfa una validità di tipo prognostico ma sarebbe interessante indagare tale eventualità.

L'interleuchina 8 (IL 8) è prevalentemente prodotta da macrofagi e cellule endoteliali. Tale citochina viene considerata un agente infiammatorio e un agente ad effetto chemiotattico per i neutrofili. La sua espressione è conseguente a danno tissutale o infiammazione (Sherwood *et Prough*, 2000). In studi di umana è stato rilevato come l'espressione di IL 8 possa assumere valore diagnostico nel sangue prelevato dal cordone ombelicale di neonati in corso di sepsi (Berner *et al.*, 2000). Nella nostra indagine l'espressione di IL 8 ha mostrato valori più elevati in soggetti settici rispetto al gruppo dei sani, ma tale differenza non è stata supportata da validità statistica, data la grande deviazione standard riscontrata fra i valori dei setticemici.

L'interferone γ (IFN γ) è prodotto dalla sottopopolazione linfocitaria Th1 che viene coinvolta in corso di risposta immunitaria cellulo mediata verso patogeni intracellulari (O'Garra, 1998). In nessuno dei puledri è stata rilevata espressione di tale mediatore immunitario valutabile dal nostro limite di *detection* (3 copie) a conferma di altri studi effettuati (Breathnach *et al.*, 2006). Tale deficienza rende i puledri neonati vulnerabili all'infezione determinata dai organismi intracellulari appunto quali *Rhodococcus equi* (Prescott, 1991) e *rotavirus* (Powell *et al.*, 1997).

L'interleuchina 1 beta è stata rilevata nel *buffy coat* di gran parte dei puledri sottoposti a prelievo con una differenza statisticamente rilevante fra soggetti sani e settici. Tale citochina è

coinvolta nei processi di fase acuta e nella risposta pirogena alle infezioni, oltre ad agire come proliferatore dei linfociti (Dinarelo, 1999). Si è notato che tale citochina è coinvolta in modelli di endotossiemia ma il suo blocco non ha portato a grandi risultati nei soggetti trattati se non una riduzione della neutrofilia circolante (Granowitz *et al.*, 1993).

Tale studio ha permesso di tracciare un quadro d'insieme per quanto riguarda l'espressione di citochine coinvolte nella risposta immunitaria in puledri. Tali parametri, correlati con i valori emato-biochimici e clinici non fanno che permettere una maggior comprensione nella diagnosi delle patologie neonatali in ambito equino. Sarebbe utile in futuro focalizzare la ricerca anche su marcatori immunitari coinvolti nella cosiddetta sindrome da risposta antinfiammatoria quali IL 10 mettendoli in relazione con i parametri da noi valutati della componente proflogogena al fine di valutare squilibri in entrambi i fronti immunitari. Tale ricerca potrebbe portare in futuro risvolti in campo applicativo con l'obiettivo di stabilire una terapia idonea che permetta la sopravvivenza in corso di sepsi neonatale dei puledri.

4.8 Sperimentazione 8

La parvovirosi canina come modello di sepsi

4.8.1 INTRODUZIONE

Nonostante l'insulto primitivo sia virale, la mortalità associata a parvovirosi è legata alla traslocazione batterica seguente al danno subito dalla mucosa enterica, alla setticemia da *E.coli*, alla risposta infiammatoria sistemica e allo shock come illustra l'immagine sottostante (**Fig 1**).

La Parvovirosi rappresenta una patologia con una origine intestinale di Sepsis e conduce a conseguenze del tutto simili a quelle riscontrate nell'uomo, quali coagulopatia, disfunzione organica multipla, sindrome da distress respiratorio acuto e morte.

Trial clinici sviluppati su questa popolazione di cani potrebbero quindi fornire informazioni riguardo la Sepsis derivante dall'alterazione primaria della barriera intestinale o da fenomeni ischemici.

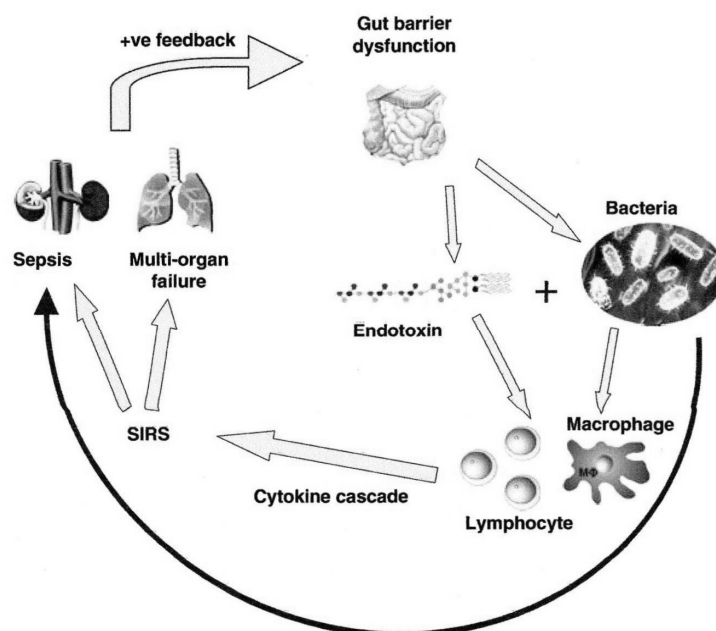


Fig. 1 Origine enterica di Sepsis: traslocazione batterica (Gatt *et al.*, 2007).

Il fatto che la Parvovirosi canina possa rappresentare un valido modello di Sepsis, sia per il cane che per l'uomo, è basato su diversi riscontri.

La prima evidenza della presenza di batteriemia associata all'infezione da parvovirosi fu riportata in uno studio di Turk che isolò *E.coli* nel fegato e nel polmone del 90% dei cani morti per tale virus (Turk *et al.*, 1990). Isogai e collaboratori (Isogai *et al.*, 1989) hanno evidenziato un aumento del livello di endotossina nel sangue di cani infettati con parvovirus per via naturale o sperimentale e in uno studio condotto su 40 cani con Parvovirosi, il livello plasmatico di LPS risultava significativamente più elevato rispetto a cuccioli sani o cani, che erano stati infettati da parvovirosi, 30 giorni dopo la guarigione (Otto *et al.*, 2001).

In corso di esposizione acuta al LPS, TNF rappresenta uno dei primi mediatori infiammatori che vengono prodotti e la cui concentrazione plasmatica risulta elevata. In uno studio clinico condotto su cani infetti da parvovirus, TNF è stato rilevato in circolo in 7 cani su 17 e i livelli più alti erano associati ad un maggiore tasso di mortalità (Otto *et al.*, 1997).

La fase precoce della Sepsis è caratterizzata da uno stato di ipercoagulabilità che è stato rilevato in uno studio condotto su 9 cani infetti da parvovirus dove tutti e 9 presentavano alterazioni tromboelastografiche, iperfibrinogenemia, ridotti livelli di antitrombina e aumento di aPTT (Otto *et al.*, 2000).

La Parvovirosi canina presenta diversi vantaggi per il suo utilizzo come modello di Sepsis. Presenta infatti un decorso altamente prevedibile e molte delle risposte fisiologiche a tale infezione sono state caratterizzate.

Un aspetto importante è poi la facilità di diagnosi che è basata sull'evidenza dei segni clinici (in particolare depressione del sensorio, vomito e diarrea emorragica) e può essere confermata dalla diagnosi di laboratorio rilevando il virus a livello fecale con metodiche biomolecolari quali la PCR che è altamente sensibile e specifica (Mochizuki *et al.*, 1993).

Accanto a questi aspetti positivi, esistono però anche diversi limiti.

Il maggior problema che si pone riguardo all'inserimento di cani in diversi trial clinici, così come per altri animali utilizzati come modello di Sepsis, è la mancanza di un sistema validato di stadiazione che permetta di definire la gravità del processo in atto e di individuare una popolazione omogenea di studio.

Non tutti i cani affetti da parvovirosi vanno incontro a SIRS e, come nell'uomo, i parametri clinici utilizzati per la diagnosi di tale sindrome non sono accurati: in uno studio retrospettivo su 77 cani parvoviroici si è valutato come all'84% di questi sarebbe stata diagnosticata la presenza di SIRS utilizzando i criteri di Hauptman, mentre utilizzando i più stretti criteri di Okano, solo al 29%. Nello stesso studio, il 49% dei cani presentava 2 criteri su 3 di SIRS (la conta dei leucociti non è stata considerata per la panleucopenia indotta dal virus), ma nessun parametro, né individualmente, né in combinazione con altri, era in grado di predire la mortalità o la durata del ricovero. I cani non sopravvissuti, però, presentavano la maggior percentuale dei cani con 2 criteri presenti su 3, suggerendo che il fallimento nel risolvere le alterazioni metaboliche della SIRS può rappresentare un indicatore di prognosi sfavorevole (Mantione e Otto, 2005).

L'incapacità di stadiare la condizione clinica del paziente può essere in parte superata mediante lo sviluppo di un sistema di punteggio in grado di indicare la gravità del processo in atto. Tale sistema dovrebbe poter essere applicato ad ogni tipo di paziente e malattia, dovrebbe essere indipendente dalla diagnosi e dovrebbe basarsi su informazioni ottenibili precocemente nel corso dell'ospedalizzazione, cioè prima che venga impostato un intervento terapeutico (King *et al.*, 2001).

Un'altra limitazione all'utilizzo del modello parvovirus per lo studio della Sepsis dell'uomo è il fatto che, a differenza di quanto è documentato in pazienti umani, un trattamento aggressivo di supporto può portare ad un tasso di sopravvivenza superiore al 90%.

La dimensione ridotta dei cuccioli con Parvovirosi può inoltre impedire un prelievo ematico frequente per lo studio di possibili *biomarker* e i cani affetti sono spesso "immaturi" dal punto di vista immunitario, mentre la maggior parte dei casi di Sepsis nell'uomo si verificano in soggetti adulti. Infine, la leucopenia indotta dal virus può influire notevolmente sulla risposta immunitaria o comunque rende la conta leucocitaria un parametro inaffidabile nella diagnosi di SIRS (Otto, 2007).

4.8.2 MATERIALI E METODI

Lo studio sperimentale descritto in questa tesi si pone l'obiettivo di mettere a punto una serie di protocolli ai fini di valutare l'espressione genica di diversi marker di flogosi in termini di RNA trascritto nei tessuti patologici di cani affetti da parvovirosi, essendo tale patologia un modello di studio di SIRS. In particolare si è valutata l'espressione dei geni relativi alla procalcitonina e a tre citochine di fase acuta, IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Selezione della popolazione e criteri di inclusione

La popolazione oggetto di studio è rappresentata da cani affetti da parvovirosi e da soggetti che mostravano un quadro clinico di SIRS, pervenuti al Dipartimento Clinico Veterinario dell'Università di Bologna e deceduti o sottoposti ad eutanasia per l'insorgenza di un quadro clinico compatibile con una sindrome da disfunzione multiorganica (MODS).

La diagnosi clinica di parvovirosi è stata confermata dal laboratorio che ha evidenziato la presenza di CPV-2 nelle feci mediante l'applicazione di metodiche biomolecolari quali la Polymerase Chain Reaction (PCR).

L'inclusione dei soggetti nella popolazione di studio è legata alla presenza di più di 2 dei parametri di SIRS proposti da Okano: frequenza cardiaca >160 battiti/min, frequenza respiratoria >40 atti/min, temperatura >39,7°C o <37,7°C e leucociti >12.000/ μ l o <4000/ μ l (Okano *et al.*, 2002).

Inoltre, grazie alla collaborazione esistente tra il Dipartimento Clinico e il Department of Clinical Studies-Philadelphia dell'Università della Pennsylvania, è stato possibile testare tessuti provenienti da un soggetto sano.

Diagnosi molecolare di CPV-2

Estrazione DNA virale

L'estrazione del DNA virale dai campioni biologici, necessaria per l'amplificazione genica, è stata effettuata mediante l'impiego del DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Germania). Si tratta di un kit commerciale che, attraverso l'impiego di diversi reagenti e di colonnine dotate di una membrana filtrante in gel di silice, permette la purificazione del DNA virale contenuto nel materiale di partenza e l'eliminazione di tutti i contaminanti presenti nei campioni biologici, come proteine, nucleasi ed altri inibitori.

Viene prelevato con un tampone un piccolo quantitativo del campione di partenza, nel nostro caso è costituito da feci, e viene stemperato in 200 μ l di PBS. Si aggiungono poi 20 μ l di proteinasi K e 200 μ l di Buffer AL, dopo avere agitato nel vortex, la mix si pone ad incubare a 55°C per tempi variabili da 1 a 3 ore, vortexando occasionalmente.

La mix ottenuta è stata posta ad incubare a 70°C per 10 minuti, successivamente sono stati aggiunti 200 μ l di etanolo al 100% ed è stata agitata nuovamente nel vortex.

Tutta la mix ottenuta è stata trasferita nella spin-column e centrifugata a 6000Xg per un minuto, dopo avere sostituito il tubo di raccolta sono stati aggiunti 500 μ l di BUFFER AW1 ed è stata centrifugata a 6000Xg per un minuto.

Sostituito il tubo di raccolta, sono stati aggiunti 500 μ l di BUFFER AW2 ed è stata centrifugata a massima velocità per 3 minuti.

La spin-column è stata posta in una *epENDORF* pulita e sono stati aggiunti 200 μ l di BUFFER AE sulla membrana, dopo un minuto di incubazione a temperatura ambiente è stata centrifugata a 6000Xg per un minuto per l'eluizione.

Polymerase Chain Reaction

La tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ideata da Mullis nel 1985, è una reazione enzimatica *in vitro* che consiste nella sintesi ciclica di DNA, le cui molecole vengono moltiplicate fino a raggiungere un numero molto elevato di copie. Questa polimerizzazione è sequenza-specifica, in quanto solo i tratti di DNA caratterizzati dalla sequenza di interesse alle estremità sono oggetto di sintesi e amplificazione grazie ad un meccanismo di riconoscimento delle estremità della sequenza bersaglio tramite l'appaiamento di queste regioni con oligonucleotidi complementari specifici che guidano la reazione.

Ogni ciclo della reazione di PCR comincia dalla dissociazione, per riscaldamento, delle due eliche del DNA bersaglio (*denaturazione*). Nella seconda fase interviene la coppia di **oligonucleotidi specifici**, lunghi ciascuno circa una ventina di basi. Ciascuno di essi può appaiarsi specificamente con una delle due eliche del DNA bersaglio (*annealing*) e, in virtù delle sue dimensioni ridotte, l'associazione dell'oligonucleotide compete vantaggiosamente con la riassociazione delle due eliche tra loro. In questo modo gli estremi 5' degli oligonucleotidi segnano su ciascuna elica gli estremi del frammento che viene amplificato, mentre i loro estremi 3' offrono alla **DNA polimerasi** il gruppo idrossilico di innesco della reazione, che progredisce contemporaneamente su entrambe le eliche, nelle due direzioni antiparallele con l'estensione (*estension*) dei due oligonucleotidi tramite i nucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione.

Alla fine del primo ciclo, quindi, il frammento bersaglio compreso fra le sequenze dei due oligonucleotidi è stato duplicato, e il secondo ciclo sottopone, ora, due copie del frammento al procedimento di *denaturazione*, *annealing* ed *estensione*; al termine di quest'ultimo, le coppie del frammento sono diventate quattro, e così via, per 20-50 cicli di amplificazione successivi. Poiché ogni ciclo della reazione dura solo pochi minuti, nel giro di qualche ora si possono produrre elevatissime quantità di DNA bersaglio. Si calcola, infatti, che dopo 20 cicli di reazione, per ogni molecola bersaglio originariamente presente, siano state prodotte 10^{12} copie, tutte uguali alla molecola di partenza (**fig. 1.1**).

La miscela di reazione contiene i *primers* specifici, i nucleotidi trifosfati, un tampone di reazione adatto all'enzima, il DNA bersaglio e l'enzima DNA polimerasi termostabile.

La reazione di PCR si basa sull'utilizzo di DNA polimerasi isolate da microrganismi termofili, in grado di vivere a temperature molto elevate. Gli enzimi ottenuti da questi microrganismi risultano, infatti, stabili alle temperature alle quali viene sottoposto il DNA per poter essere denaturato (circa 95°C).

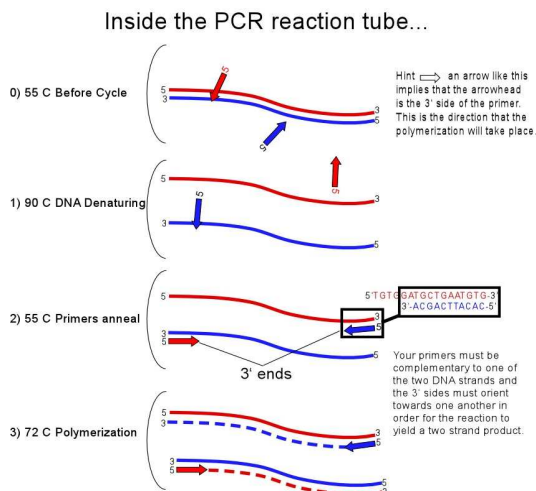


Fig. 1.1 Schema della tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Specificità dell'amplificazione e selezione dei primers.

La specificità dell'amplificazione dipende dalle caratteristiche dei *primers* selezionati per l'appaiamento specifico alla sequenza target (**tab. 1.1**). Per campioni complessi di DNA, come il DNA genomico totale di una cellula di mammifero o il genoma totale di un virus a DNA, spesso è sufficiente progettare due *primer* lunghi 20 nucleotidi ciascuno. Questo perché, in condizioni normali, la probabilità che si verifichi accidentalmente un appaiamento perfetto in un qualche punto del genoma per ciascuno dei *primer* è estremamente bassa, e la probabilità che entrambe le sequenze si trovino per caso a stretto contatto nella direzione specificata è veramente remota. Anche se solitamente vengono scelte condizioni tali da assicurare che siano stabili soltanto le doppie eliche costituite da *primers* e sequenza bersaglio perfettamente appaiate, è comunque possibile osservare prodotti spuri di amplificazione (prodotti aspecifici). Questo può succedere se una o entrambe le sequenze scelte come *primer* contengono parte di una sequenza di DNA ripetitivo, anche se solitamente i *primers* sono scelti in modo da evitare l'appaiamento con questo tipo di sequenze.

<i>Lunghezza</i>	Solitamente si utilizzano primer di 18-24 nucleotidi di lunghezza. La lunghezza del primer garantisce la specificità e riduce la possibilità di legame in siti non specifici. Tuttavia, primer più lunghi di 24 basi non garantiscono una maggiore specificità in quanto possono portare ad appaiamenti interni aspecifici.
<i>Composizione in basi</i>	Sostanzialmente vanno evitate le unità ripetute in tandem di uno o più nucleotidi. La % complessiva in GC deve essere intorno al 40-60% o rispecchiare il contenuto di GC del DNA bersaglio. Si consiglia di disegnare dei primers nei quali la maggiore quantità di G e C sia nella regione centrale o all'estremità 5', al fine di incrementarne la stabilità e di conferire una maggiore stabilità al complesso primer-sequenza target.
<i>Struttura secondaria Estremità 3'</i>	Vanno evitate sequenze la cui struttura secondaria tenda a formare ripiegamenti a forcina. Va evitata la complementarità tra le due basi all'estremità 3' dei due primer, altrimenti essi possono formare dei dimeri, che riducono l'efficienza dell'amplificazione. Inoltre, è preferibile disegnare primer con almeno tre A o T nelle ultime 5 basi al 3', evitando regioni ricche di GC in questa estremità. Infine, è importante evitare nucleotidi aspecifici proprio in tale regione, in quanto è necessario che gli ultimi nucleotidi al 3' si appaino perfettamente alla sequenza bersaglio per dare inizio alla reazione di estensione ad opera della polimerasi.

Tab. 1.1 Regole per la progettazione dei *primers* per la PCR.

Un altro importante parametro che caratterizza i primers è la *temperatura di melting* (T_m). Essa rappresenta la temperatura alla quale il 50% del primer e della sequenza bersaglio sono presenti sotto forma di una molecola a doppio filamento. La T_m è necessaria per stabilire la temperatura di annealing della PCR. Teoricamente, una temperatura di annealing deve essere abbastanza bassa da garantire l'ibridizzazione del primer alla sequenza target, ma sufficientemente alta da limitare gli appaiamenti aspecifici. La temperatura di annealing viene solitamente stabilita

intorno a 3°C al di sotto della T_m dei primer o di quella del primer a T_m inferiore nel caso in cui i due primer utilizzati abbiano due T_m diverse.

Per calcolare la T_m di un primer si possono utilizzare diverse formule, ma le due più comunemente utilizzate sono:

1) $T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A+T})$

2) $T_m = 81,5 + 16,6 \times (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 \times (\% \text{G+C}) - 675/n$

Dove n = numero di basi e

$[\text{Na}^+]$ = cationi monovalenti come Na^+ o K^+ .

La prima di queste formule è valida per *primer* con meno di 18 basi, mentre la seconda si basa sul contenuto di GC del primer e sulla concentrazione di sali nella reazione e può essere applicata anche a *primer* più lunghi.

Polymerase Chain Reaction gene VP2

Una volta estratto il DNA virale, l'intero gene VP2 è stato amplificato mediante PCR utilizzando la coppia di primers **P1** forward (5'-ATG AGT GAT GGA GCA GTT C-3') e **VPR** reverse (5'-TTT CTA GGT GCT AGT TGA G-3') (Mochizuki *et al.*, 1993).

Per eseguire l'amplificazione è stata utilizzata la *Taq* Qiagen (Clontech, USA). La mix è stata preparata come riassunto nella **tabella 1.2**.

Componenti	Concentrazione iniziale	Volume/reazione	Concentrazione finale
Buffer	10X	5 µl	1X
dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Q solution	5X	10 µl	1X
Primer P1	20 picomoli	1 µl	0,4 µM
Primer VPR	20 picomoli	1 µl	0,4 µM
Taq	5U/µl	0,25 µl	2,5U
Template DNA	-	5 µl	
Distilled water		26,75 µl	
Total volume		50 µl	

Tab. 1.2 Protocollo utilizzato per la reazione di amplificazione del gene VP2.

Il ciclo di amplificazione utilizzato è schematizzato nella **tabella 1.3**:

	TEMPERATURA	TEMPO PER CICLO	N° CICLI
DENATURAZIONE INIZIALE	94 °C	5 min	1
DENATURAZIONE	94°C	30 sec	40
APPAIAMENTO PRIMERS	54°C	30 sec	
ESTENSIONE FILAMENTO DI DNA	72°C	1 min	
ESTENSIONE FINALE	72°C	7 min	1

Tab. 1.3 Ciclo di amplificazione per VP2.

Raccolta dei campioni

I campioni sono stati prelevati in sede autoptica. I tessuti prelevati sono tiroide, milza, polmone e fegato che sono stati posti in Eppendorf da 1,5 ml e conservati a -80°C fino al momento della processazione.

Estrazione RNA

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti utilizzando due metodiche: il TRIZOL[®]-Reagent (Sigma, Germania) e l'RNeasy mini kit (Qiagen, Germania). L'estrazione mediante TRIZOL[®] è stata effettuata nel caso in cui la quantificazione allo spettrofotometro dell'RNA estratto con il kit Qiagen evidenziasse scarse quantità tali da produrre falsi negativi alla reazione di amplificazione. Il Trizol-Reagent permette infatti di ottenere una maggior quantità di RNA estratto, ma con una purezza inferiore rispetto a quello che si può ottenere con il kit Qiagen..

Estrazione RNA con QIAGEN RNEASY PLUS MINI KIT

L'RNeasy plus mini kit utilizza un sistema di colonnine dotate di uno speciale filtro costituito da una membrana di gel di silice (spin column), che garantisce la purificazione dell'RNA dal materiale di partenza grazie al legame selettivo dell'RNA stesso alla membrana (**fig. 1.2**).

I contaminanti presenti nel campione biologico, quali proteine, nucleasi ed altri inibitori, vengono eliminati con apposite soluzioni di lavaggio.

Una piccola porzione di tessuto, ancora congelato, è stata sminuzzata con mortaio e pestello. A 30 mg di tale omogenato, posti in una eppendorf sterile, sono stati aggiunti 600 μ l di una soluzione preparata con 1 ml di buffer RTL plus addizionato di 10 μ l di β -mercaptoetanolo. Tale soluzione ha la funzione di distruggere e lisare il campione grazie alla presenza di agenti denaturanti come la guanidina isotiocianato e il β -mercaptoetanolo.

Il tessuto così trattato è stato omogenato utilizzando un pestellino e poi centrifugato per 3' alla massima velocità. Il surnatante è stato posto in una gDNA eliminator spin column e centrifugato 30" a 8.000xg.

Si è conservato il contenuto della spin column all'interno del tubo di raccolta ed è stato addizionato di 600 μ l di etanolo al 70% e vortexato energicamente. La soluzione è stata trasferita in una RNeasy spin column, 700 μ l per volta, e centrifugata a 8000xg per 15" consentendo all'RNA di rimanere adsorbito alla membrana. Sono stati fatti dei lavaggi per eliminare i contaminanti utilizzando nell'ordine: 700 μ l di buffer RW1 e centrifugando la spin column a 8000xg per 15", 500 μ l di buffer RPE e centrifugando a 8000xg per 15", ed infine un secondo lavaggio con il buffer RPE e centrifugando per 2' alla massima velocità. Il buffer RPE contiene etanolo ed è importante eliminare qualsiasi suo residuo per evitare interferenze con l'eluizione finale, per cui si è reso necessario centrifugare la spin column ancora per 1' alla massima velocità.

L'eluizione finale dell'RNA è stata realizzata deponendo 50 μ l di acqua RNase free direttamente sulla membrana e centrifugando per 1' a 8000xg. L'RNA così eluito è stato stoccato a -80°C fino al momento del suo utilizzo.

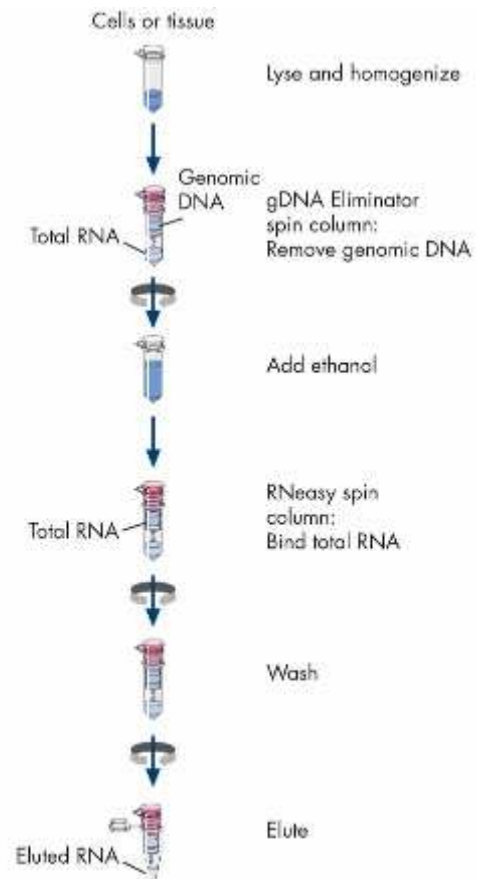


Fig. 1.2 Procedura di estrazione dell'RNA con Rneasy plus mini kit.

Estrazione RNA con TRIAGENT

Questo sistema d'estrazione si basa su una soluzione pronta all'uso, contenente guanidina isotiocianato e fenolo (pH 5-6). Tale solvente permette la formazione di complessi tra l'RNA, il guanidinio e le molecole d'acqua, ed esclude il DNA e le proteine, ostacolando la formazione di interazioni idrofiliche del DNA e delle proteine per sottrazione del substrato acquoso.

Per il protocollo si rimanda al capitolo Metodi.

Il pellet è stato asciugato all'aria e poi risospeso in 40 μ l di Rnase-free water. L'RNA è stato poi conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Al termine dell'estrazione, l'RNA estratto è stato quantificato tramite lettura allo spettrofotometro (Biophotometer, Eppendorf, Germania) dove si è valutato il quantitativo di RNA in ng/μl e il rapporto 260/280, indice di purezza.

Retrotrascrizione

La retrotrascrizione dell'RNA è avvenuta dopo trattamento con DNAsi in modo da evitare l'amplificazione di materiale genomico di tipo desossiribonucleico che può forviare i risultati ottenuti a livello di espressione qualitativa genica. Nel caso infatti residui del materiale di natura desossiribonucleica nell'estratto, l'attacco dei primers al gene target in corso di amplificazione porterà a due diverse tipologie di amplificato: il primo contenente anche gli introni e caratterizzato da una lunghezza del frammento maggiore, il secondo più corto contenente solo gli esoni.

Sono stati posti ad incubare 9 μl di RNA estratto con 1 μl di enzima DNAsi per 20 minuti a 37°C e successivamente a 95°C per 5 minuti per inattivare l'enzima.

Per poter amplificare mediante l'RNA, è necessario che questo venga retrotrascritto in un filamento di DNA complementare (cDNA) fornendo così un appropriato substrato per le polimerasi; questo procedimento si chiama Trascrizione Inversa (*Reverse Transcription*).

Gli enzimi che si utilizzano per questo tipo di reazione sono le trascrittasi inverse dei retrovirus, delle DNA-polimerasi-RNA-dipendenti. Queste polimerasi possiedono, oltre all'attività polimerasica, un'attività Rnasica e sono quindi in grado sia di produrre un filamento di DNA a partire da uno di RNA, che di degradare eventuali residui di RNA stampo non retrotrascritti, al fine di evitare la formazione di dimeri RNA-DNA che potrebbero ridurre l'efficienza della reazione della PCR seguente.

Per la retrotrascrizione sono stati utilizzati 2 diversi primers universali:

- gli esameri (*Random Hexamers*) che si allineano con siti multipli disposti lungo tutto il filamento di RNA generando dei cDNA di lunghezza variabile. Questo metodo è spesso usato per retrotrascrivere anche le estremità 5' o delle sequenze poco note e generare cDNA anche a partire da un RNA con strutture secondarie particolari;
- gli *Oligo d(T)* che riconoscono la coda di poli A presente all'estremità 3' degli RNA messaggeri.

Nel nostro caso per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato l'enzima *Reverse Transcriptase* derivante dal Virus della Mieloblastosi Aviare (AMV) (Takara, Japan).

E' stata preparata una miscela aggiungendo 5 μl di RNA in un volume totale di reazione di 20 μl contenente i reagenti elencati nella **tabella 1.4**. La reazione di retrotrascrizione è stata incubata a 30°C per 10 minuti, a 45°C per 15 minuti e 2 minuti a 99°C.

REAGENTI	CONCENTRAZIONE INIZIALE	VOLUME	CONCENTRAZIONE FINALE
MgCl ₂	25mM	4 µl	5 mM
RNA PCR Buffer	10X	2 µl	1X
dNTP Mixture	10 mM ciascuno	2 µl	1 mM
Rnase Inhibitor	40 unità/µl	0,5 µl	1 unità/µl
Random Hexamers	50 picomoli/µl	0,5 µl	2,5 µM
Oligo d(t)	2,5 picomoli/µl	0,5 µl	0,125 µM
Riverse Transcriptase	5 unità/µl	1 µl	0,25 unità/µl
Rnase Free distilled water		4,5 µl	
RNA	0,2-2 µg	5 µl	
Total volume		20 µl	

Tab. 1.4 Protocollo di retrotrascrizione RNA LA PCR Kit (AMV) Ver 1.1Takara Japan.

Polymerase Chain Reaction per i marker di flogosi

Nel corso del nostro studio le coppie di *primers* utilizzate per l'amplificazione dei diversi marker, sono state disegnate mediante il software Oligo Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA). E' stata progettata una coppia di primers per ogni target (**tab. 1.5**). Per ottimizzare la resa dell'amplificazione si è ricorsi anche all'utilizzo di reazioni di amplificazione a gradiente in modo da identificare la temperatura ottimale per l'appaiamento dei due primer di interesse.

Target	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Frame (bp)
CALC-I	ATCATGGGCTTGTGGAAGT	TTCACCAGGGCAGCCAGCA	361
IL-1β	AGAAAGCTGAAGAAGCCCT	CCTGTAACCTGCAGTCCAC	154
IL-6	TGCCACTTCAAATAGTCTA	AGTTTGGGAAGATGTAGGT	168
TNF-α	TGCCGTCAGATGGGTTGTA	TTGATGGCAGAGAGTAGGT	145

Tab. 1.5 Sequenze dei *primers*.

Per la reazione di amplificazione del gene CALC-I, dopo avere provato diverse *Taq* polimerasi con risultati incostanti e non ripetibili, si è scelto di utilizzare la Titanium *Taq* PCR kit (Clontech) che consente di amplificare cDNA ricco in GC, a struttura secondaria complessa quale il genoma totale. Sono stati aggiunti 2,5 µl di cDNA alla miscela contenente i reagenti elencati nella **tabella 1.6** per un volume totale di 25 µl.

Componenti	Concentrazione iniziale	Volume/reazione	Concentrazione finale
Buffer	10x	2,5 µl	1X
dNTP	10 mM	0,5 µl	200 µM
Primer forward	20 picomoli	0,5 µl	0,8 µM
Primer reverse	20 picomoli	0,5 µl	0,8 µM
Taq	50X	0,5 µl	1X
Template DNA	-	2,5 µl	
Distilled water		18 µl	
Total volume		25 µl	

Tab. 1.6 Componenti reazione di amplificazione con Taq Titanium.

Ai fini della messa a punto di una temperatura di annealing ottimale, si è allestito un gradiente, con temperature comprese tra i 57 e 61°C. La temperatura ottimale si è rilevata a 59°C. La reazione di amplificazione è avvenuta secondo il seguente ciclo (**tab 1.7**):

	TEMPERATURA	TEMPO PER CICLO	N° CICLI
INATTIVAZIONE RTasi E DENATURAZIONE INIZIALE	94 °C	5 min	1
DENATURAZIONE	94°C	30 sec	40
APPAIAMENTO PRIMERS	59°C	30 sec	
ESTENSIONE FILAMENTO DI DNA	68°C	1 min	
ESTENSIONE FINALE	68°C	7 min	1

Tab. 1.7 Protocollo utilizzato per la reazione di amplificazione per CALC-I.

Le reazioni di amplificazione per le citochine sono state invece eseguite utilizzando il Kit Takara LA PCR aggiungendo 2,5 µl di cDNA alla mix preparata su un volume totale di 22,5 µl, come schematizzato nella **tabella 1.8**.

Componenti	Concentrazione iniziale	Volume/reazione	Concentrazione finale
Buffer	10X	2 µl	1X
MgCl ₂	25mM	1,5 µl	1,6 mM
Primer forward	20 picomoli	0,5 µl	0,8 µM
Primer reverse	20 picomoli	0,5 µl	0,8 µM
Taq	5 U/µl	0,125 µl	0,003 U
Distilled water		15,375 µl	
Template DNA	-	2,5 µl	
Total volume		22,5 µl	

Tab. 1.8 Componenti reazione di amplificazione con Taq Takara.

Anche in questo caso sono state messe a punto le temperature di annealing per ogni coppia di primer, allestendo i diversi gradienti di temperatura per ogni citochina; le temperature ottimali rilevate e il ciclo di amplificazione sono riportate nella **tabella 1.9**.

	TEMPERATURA	TEMPO PER CICLO	N° CICLI
INATTIVAZIONE RTasi E DENATURAZIONE INIZIALE	94 °C	5 min	1
DENATURAZIONE	94°C	30 sec	40
APPAIAMENTO PRIMERS	55°C (IL-1β) 58°C (IL-6) 56°C (TNF-α)	30 sec	
ESTENSIONE FILAMENTO DI DNA	72°C	1 min	
ESTENSIONE FINALE	72°C	7 min	1

Tab. 1.9 Ciclo di amplificazione per le citochine.

Contemporaneamente ai campioni sono stati processati un bianco (acqua ultrapura sterile) e come controllo positivo il gene *housekeeping* gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), codificante la β -actina, impiegando i primers 5'-GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA-3' (senso) e 5' - CCC TCC ACG ATG CCA AGT (antisenso).

I prodotti della PCR sono stati visualizzati con corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con Bromuro di Etidio, caricando 5 μ l di amplificato insieme a 1 μ l di Loading Buffer 6X Blu di bromofenolo. La specificità del prodotto è stata valutata con l'uso di un marker di riferimento DNA Ladder 100 bp (Biolabs, New England, UK).

Purificazione e sequenziamento

In seguito all'evidenziazione di una banda aspecifica di minori dimensioni formatasi nel corso dell'amplificazione del TNF, si è deciso di sequenziarla ai fini di verificare la specificità dell'amplificato. Il prodotto di PCR è stato purificato mediante l'impiego del kit "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche Diagnostics), che consente di separare l'amplificato dagli altri reagenti utilizzati nella reazione di PCR che andrebbero ad interferire nella reazione di sequenziamento.

Il DNA così purificato è stato quantificato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1% colorato con bromuro di etidio, mediante l'utilizzo del software Quantity One (BIORAD, USA). Il programma "Quantity One" determina la concentrazione del campione raffrontando l'intensità di fluorescenza della sua banda, risultante dalla corsa elettroforetica, con quelle di una serie di bande a concentrazione nota introdotte dall'operatore. La fluorescenza viene rilevata per mezzo del transilluminatore a luce UV "Fluor S".

Per il sequenziamento sono necessari 13 ng di amplificato purificato per le prime 100 bp più 10 ng ogni 100 bp e 10 picomoli del primer TNF- α forward; il campione è stato inviato presso un centro di sequenziamento esterno (Bio-Fab-Research, Roma).

Le sequenze nucleotidiche risultanti sono state visualizzate e corrette mediante il programma "CHROMAS" versione 2.13; in seguito sono state allineate con sequenze di referenza disponibili su GenBank utilizzando il metodo ClustalW implementato nel programma MegAlign (DNASTAR software, Lasergene Inc., USA).

Ai fini di risalire all'identità della sequenza ottenuta, la stessa è stata analizzata mediante le risorse disponibili su BLAST search (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>). BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) è un programma che permette di allineare diverse sequenze sia nucleotidiche che proteiche derivanti dallo stesso organismo o da organismi diversi ed è in grado di mettere in evidenza le sequenze identiche o simili specificando anche la percentuale di omologia tra queste.

Ai fini del nostro lavoro è stato utilizzato l'algoritmo BLASTN che è in grado di trovare allineamenti simili con una sensibilità piuttosto elevata, a partire da sequenze contenenti un numero di nucleotidi superiore a 20.

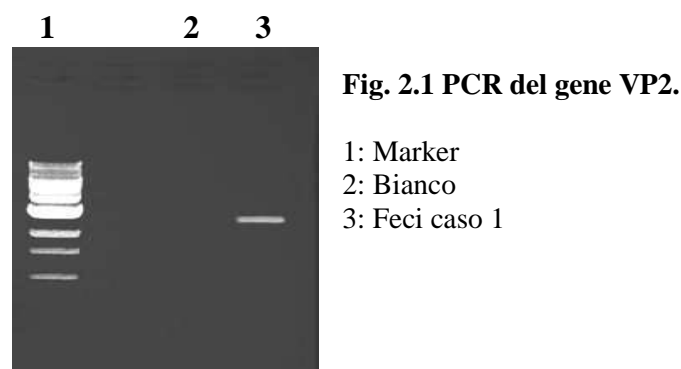
Dopo aver inserito la sequenza in BLASTN abbiamo ristretto il campo di ricerca all'interno del database alle sequenze di referenza di mRNA (refseq_rna) e al solo genoma canino.

Il programma, in seguito all'elaborazione dei dati, è in grado di fornire la posizione della sequenza omologa all'interno del genoma dell'ospite, specificando in quest'ultimo l'esatta collocazione cromosomica.

4.8.3 RISULTATI

Campioni

Sono stati selezionati 11 soggetti che rispondevano ai criteri di inclusione precedentemente definiti. Di questi 11 soggetti, 6 erano cani a cui era stata diagnosticata l'infezione da CPV-2. La PCR su materiale fecale ha evidenziato la banda attesa di 1745 bp relativa a VP2 (**fig. 2.1**).



I restanti 5 soggetti sono cani deceduti o soppressi in seguito a patologie di natura infiammatoria/infettiva. Il segnalamento, la diagnosi clinica e i parametri clinici di SIRS riscontrati nei casi oggetto di studio sono riportati nella **tabella 2.1**.

Caso n°	Segnalamento	Diagnosi	Freq. Card./min	Freq. Resp./min	Temp. °C	Leucociti/μl
1	Cane meticcio M 2m	Parvovirosi	140	24	37,5	290
2	Cane meticcio F 2m	Parvovirosi	160	36	37,6	1.900
3	Cane meticcio F 2m	Parvovirosi	140	22	34,9	220
4	Cane meticcio M 2m	Parvovirosi	156	25	36	300
5	Cane meticcio M 2m	Parvovirosi	160	40	37,1	78
6	Cane meticcio M 20gg	Parvovirosi	120	32	35,2	Impossibilità di prelievo
7	Cane meticcio F 10a	Pleurite settica	120	24	37,5	28.000
8	Cane Dobermann F 8a	Neoplasia	132	36	37,6	25.000
9	Cane Alano M 3a	Peritonite settica	146	16	38,2	57.700
10	Cane meticcio M 7a	Leptospirosi	72	94	37,7	32.600
11	Cane Pastore tedesco M 8a	MODS	144	56	38,2	30.900

Tab. 2.1 Segnalamento, diagnosi e parametri clinici di SIRS (evidenziati in rosso) riscontrati nei cani oggetto di studio.

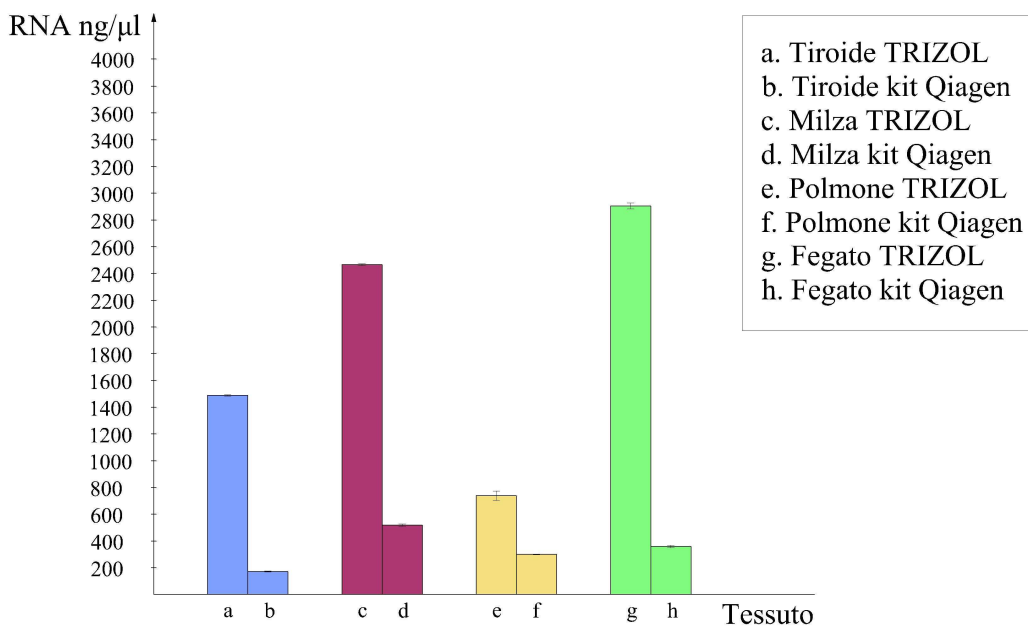
In sede autoptica sono state riscontrate lesioni compatibili con un quadro infiammatorio diffuso (tab. 2.2).

CASO n°	DIAGNOSI CLINICA	DIAGNOSI NECROSCOPICA
1	Parvovirosi	Ittero. Versamento peritoneale sierofibrinoso. Intussuscezione ileale. Enterite emorragica con deplezione delle placche di Peyer. Linfadenomegalia mesenterica ed ascellare sinistra.
2	Parvovirosi	Gastroenterite catarrale-emorragica acuta. Necrosi segmentale dell'intestino post-anastomotica. Lieve edema polmonare.
3	Parvovirosi	Enterite emorragico-necrotica con aree di deplezione cellulare delle placche di Peyer.
4	Parvovirosi	Petecchie disseminate sottocutanee, sierose, polmonari, gastriche, coliche e vescicali. Linfadenomegalia sistemica a carattere emorragico. Enterite catarrale/emorragica diffusa con aree focali depresse di deplezione cellulare delle placche di Peyer.
5	Parvovirosi	Enterite emorragica grave e diffusa del piccolo intestino. Edema polmonare lieve.
6	Parvovirosi	Ileite fibrino-emorragica. Linfadenite iperplastica.
7	Pleurite settica	Pleurite purulenta-emorragica. Gastrorragia ed ulcera gastroesofagea cronica estesa. Nefropatia cronica bilaterale ed aspetti di diffusione embolico-metastatica di natura infiammatoria visibili anche nei lobi caudali polmonari. Endocardiosi bilaterale
8	Neoplasia	Neoplasia mammaria con metastasi ai linfonodi mediastinici. Sfiacramento cardiaco. Emorragie nella regione lombare pelvica e peritracheale (coagulopatia).
9	Peritonite settica	Peritonite fibrinosa in cronicizzazione. Gastrite acuta con ulcera pilorica perforata. Peritonite purulenta saccata paragastrica. Colestasi acuta. Pleuro-polmonite purulenta embolica.
10	Leptospirosi	Nefrite cronica e petecchie renali, epatite e necrosi epatica diffusa, splenite perivascolare. Coagulopatia diffusa (versamento siero-emorragico toracico e addominale).
11	MODS	Edema polmonare acuto grave. Infarto del miocardio. Tromboendocardite aortica. Glomerulonefrite acuta diffusa. Infarto renale. Gastrite catarrale cronica ed ulcere gastriche. Pancreatite cronica. Infarti splenici. Fegato da stasi. Leydigoma.

Tab. 2.2 Diagnosi necroscopica dei casi oggetto di studio.

Estrazione RNA

I quantitativi di RNA estratto nei diversi tessuti con Qiagen Rneasy mini kit plus e Trizol Reagent® sono rappresentati nel **grafico 2.1**. Come visibile nel grafico i quantitativi di RNA estratto con il Trizol Reagent® sono notevolmente superiori rispetto a quelli ottenuti con il Kit Qiagen in tutti i tessuti analizzati. In particolare il fegato e la milza mostrano i maggiori quantitativi di RNA estratto, indice di una maggiore espressione genica in questi organi.



Graf.. 2.1 Quantitativi di RNA estratto nei diversi tessuti con Trizol reagent e Qiagen Rneasy mini kit plus.

Polymerase Chain Reaction (PCR) per i marker di flogosi

Ottimizzazione della temperatura di *annealing*

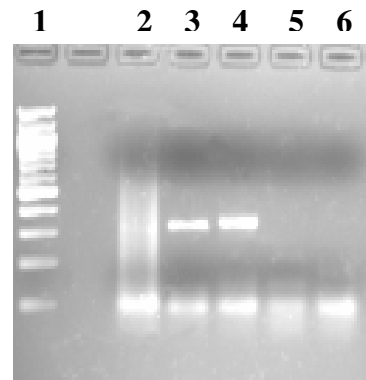
Per ottimizzare la resa dell'amplificazione si è ricorsi all'utilizzo di reazioni di amplificazione a gradiente in modo da identificare la temperatura ottimale per l'appaiamento dei due primers di interesse.

↳ **CALC-I**

La temperatura di annealing ottimale valutata con gradiente di temperatura compreso tra 57°C e 61°C si è mostrata pari a 59,4°C (**fig. 2.2**):

Fig. 2.2 Gradiente per CALC-I su milza caso 4.

- 1: Marker
- 2: Milza 56,9°C
- 3: Milza 58,1°C
- 4: Milza 59,4°C
- 5: Milza 60,2°C
- 6: Milza 61°C



↳ **Interleuchina 1 beta (IL-1 β)**

La reazione di amplificazione avvenuta con gradiente a 5 diverse temperature (54,1°C, 54,5°C, 55,6°C, 56°C, 56,5°C) ha evidenziato la banda più netta a 54,5°C.

↳ **Interleuchina (IL-6)**

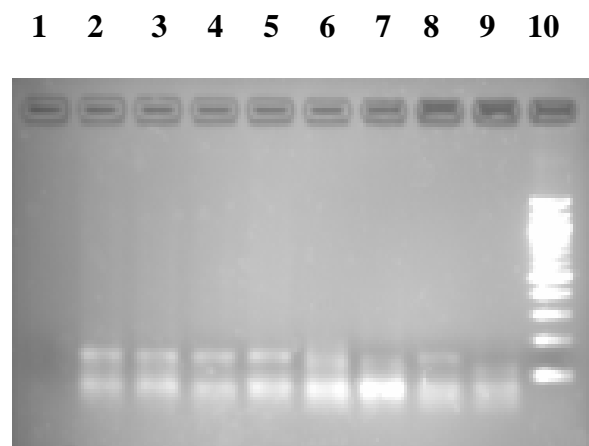
E' stata effettuata una reazione a gradiente di temperature da 57°C a 61°C valutando 5 diverse temperature di melting e si è ottenuta la banda più netta a 58°C.

↳ **Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α)**

Si è testato un gradiente di temperature da 56°C a 58,8 °C e la temperatura di melting ottimale è risultata 56°C (**fig. 2.3**).

Fig. 2.3 Gradiente per TNF- α su fegato caso 5 e 7.

- 1: Bianco
- 2: Fegato caso 7 56 °C
- 3: Fegato caso 7 56,9 °C
- 4: Fegato caso 7 57,8 °C
- 5: Fegato caso 7 58,8 °C
- 6: Fegato caso 5 56 °C
- 7: Fegato caso 5 56,9 °C
- 8: Fegato caso 5 57,8 °C
- 9: Fegato caso 5 58,8 °C
- 10: Marker



↳ Procalcitonina (CALC-I)

La PCR del gene CALC-I ha fornito un amplificato di 361 bp. La positività per espressione di CALC-I nei tessuti è stata evidenziata nelle tiroidi per tutti gli 11 casi, nelle milze in 6 su 11 casi, nei polmoni 4 su 11, nei fegati 3 su 11. I risultati sono riassunti nella **tabella 2.4**.

CASO n°	DIAGNOSI	TIROIDE	MILZA	POLMONE	FEGATO
1	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
2	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
3	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
4	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
5	Parvoviroosi	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
6	Parvoviroosi	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Pleurite settica	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
8	Neoplasia	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
9	Peritonite settica	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
10	Leptosiroosi	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
11	MODS	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo



Positivo



Negativo

Tab. 2.4 Risultati della PCR per CALC-I.

1 2 3 4 5

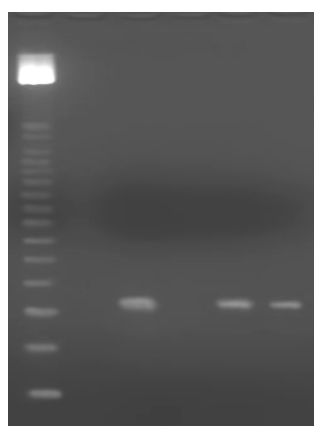


Fig. 2.4 Gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio.

- 1: Marker
- 2: Tiroide caso 10
- 3: Milza caso 10
- 4: Polmone caso 10
- 5: Fegato caso 10

Nei tessuti del soggetto sano si è riscontrata la positività per espressione di CALC-I solamente nella tiroide (**fig. 2.5**).

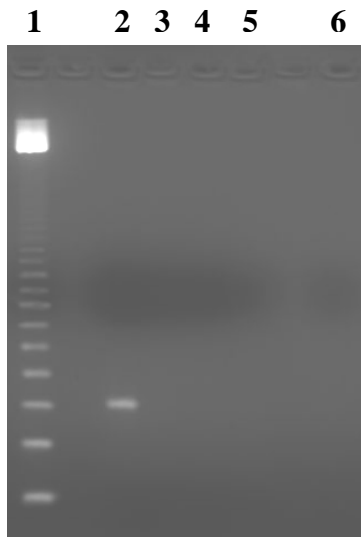


Fig. 2.5 Gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio. Tessuti del soggetto sano.

- 1: Marker
- 2: Tiroide
- 3: Milza
- 4: Polmone
- 5: Fegato
- 6: Bianco

↪ Interleuchina 1 beta (IL-1 β)

L'amplificazione del gene che esprime l'IL-1 β ha fornito la banda attesa di 154 bp. La positività per espressione di IL-1 β nei tessuti è stata evidenziata nelle tiroidi in 4 su 11 casi, nelle milze in 6 su 11 casi, nei polmoni 4 su 11, nei fegati in tutti e 11 i casi. I risultati sono riassunti nella **tabella 2.5**.

CASO n°	DIAGNOSI	TIROIDE	MILZA	POLMONE	FEGATO
1	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Parvoviroosi	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
3	Parvoviroosi	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
4	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
6	Parvoviroosi	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
7	Pleurite settica	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
8	Neoplasia	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
9	Peritonite settica	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
10	Leptosiroosi	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
11	MODS	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Positivo
 Negativo

Tab. 2.5 Risultati delle reazioni di amplificazione per IL-1 β .

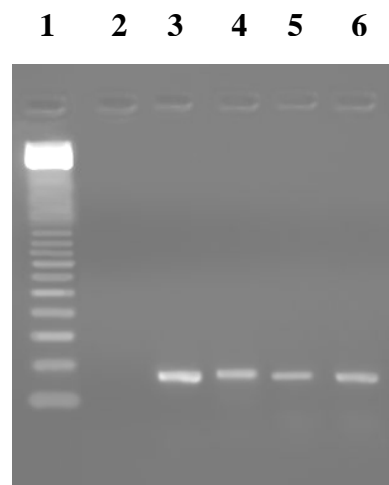


Fig. 2.6 Gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio.

- 1: Marker
- 2: Bianco
- 3: Tiroide caso 5
- 4: Milza caso 5
- 5: Fegato caso 5
- 6: Fegato caso 6

↪ Interleuchina 6 (IL-6)

La PCR per il gene dell'IL-6 ha fornito un amplificato di 168 bp. La positività per espressione di IL-6 nei tessuti è stata evidenziata nelle tiroidi per 5 su 11 casi, nelle milze in 8 su 11 casi, nei polmoni 3 su 11, nei fegati 4 su 11. I risultati sono riassunti nella tabella 2.6.

CASO n°	DIAGNOSI	TIROIDE	MILZA	POLMONE	FEGATO
1	Parvovirosi	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
2	Parvovirosi	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
3	Parvovirosi	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
4	Parvovirosi	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
5	Parvovirosi	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
6	Parvovirosi	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
7	Pleurite settica	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
8	Neoplasia	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
9	Peritonite settica	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
10	Leptosirosi	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
11	MODS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Positivo
 Negativo

Tab. 2.6 Risultati delle reazioni di amplificazione per IL-6

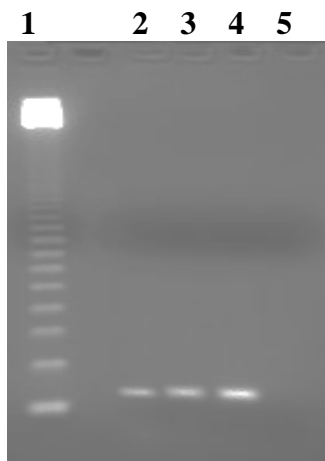


Fig. 2.7 Gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio.

1: Marker
 2: Fegato caso 4
 3: Fegato caso 5
 4: Milza caso 9
 5: Bianco

↳ Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α)

L'amplificazione del gene che esprime TNF- α ha fornito la banda attesa di 145 bp. La positività per espressione di TNF- α nei tessuti è stata evidenziata nelle tiroidi in 3 su 11 casi, nelle milze in 7 su 11 casi, nei polmoni 5 su 11, nei fegati 5 su 11. I risultati sono riassunti nella tabella 2.7.

CASO n°	DIAGNOSI	TIROIDE	MILZA	POLMONE	FEGATO
1	Parvoviroosi	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
2	Parvoviroosi	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
3	Parvoviroosi	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
4	Parvoviroosi	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
5	Parvoviroosi	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
6	Parvoviroosi	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
7	Pleurite settica	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
8	Neoplasia	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Peritonite settica	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
10	Leptosiroosi	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
11	MODS	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

■ Positivo □ Negativo

Tab. 2.7 Risultati delle reazioni di amplificazione per TNF- α .

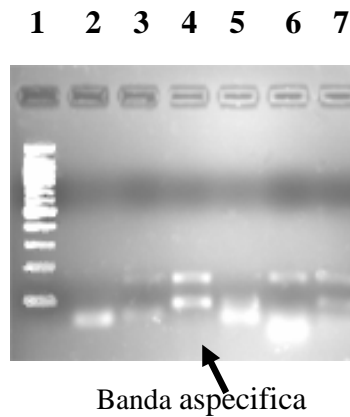


Fig. 2.8 Gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio.

- 1: Marker
- 2: Bianco
- 3: Polmone caso 5
- 4: Fegato caso 5
- 5: Tiroide caso 6
- 6: Polmone caso 6
- 7: Fegato caso 6

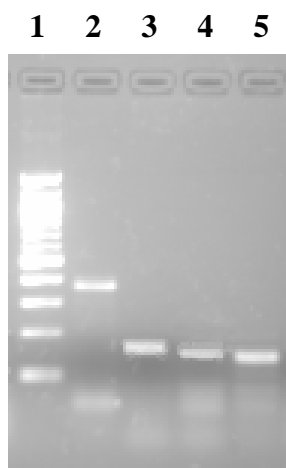


Fig. 2.9 Gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio che mostra la dimensione delle bande dei diversi *biomarker* oggetto di studio.

- 1: Marker
- 2: CALC-I
- 3: IL-6
- 4: IL-1 β
- 5: TNF- α

Il gene housekeeping GADPH, utilizzato come controllo positivo interno di reazione, ha fornito in tutti i casi, la banda attesa di 119bp.

Purificazione e sequenziamento

Come evidenziato dalla **figura 2.8**, oltre alla banda specifica del TNF- α di 145 bp, si è evidenziata la presenza di una banda aspecifica a circa 100 bp in diversi organi, con una maggior frequenza in sede epatica.

Ai fini di verificare se questa banda fosse un prodotto di amplificazione aspecifico o riconducibile all'espressione di qualche gene, si è provveduto alla sua purificazione dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% e successivo sequenziamento. La sequenza ottenuta è stata analizzata con BLAST che ha evidenziato una completa identità, di lunghezza pari a 23 nucleotidi, tra la nostra sequenza e una regione corrispondente all'mRNA che esprime il precursore della componente 2 (C2) del complemento (**fig. 2.10** e **fig. 2.11**).

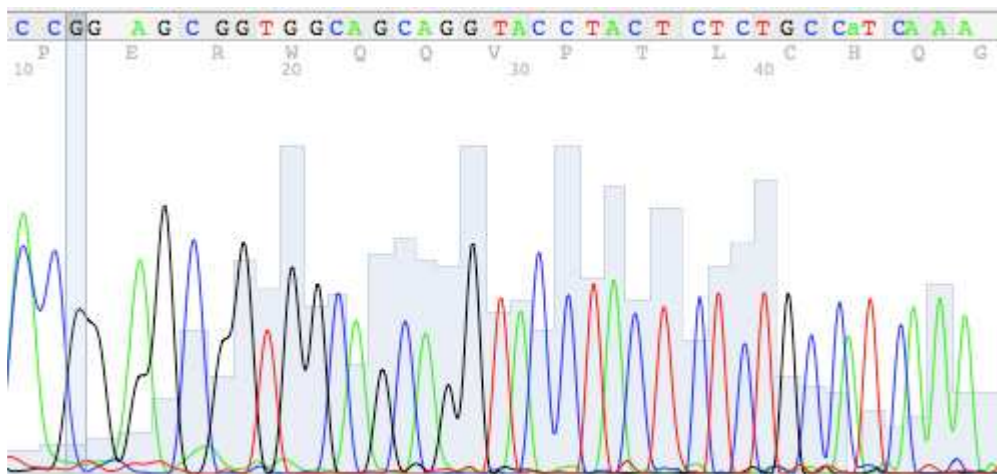


Fig. 2.10 Elettroferogramma del frammento sequenziato

```
>[ref|XM_844892.1|] UEG PREDICTED: Canis familiaris similar to complement component 2 precursor, transcript variant 2 (LOC474853), mRNA
Length=3390

GENE ID: 474853 CFB | complement factor B [Canis lupus familiaris]

Score = 46.1 bits (23), Expect = 9e-04
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 15      GCGGTGGCAGCAGGTACCTACTC 37
           |||
Sbjct 3231   GCGGTGGCAGCAGGTACCTACTC 3253
```

Fig. 2.11 Risultati dell'analisi con BLAST della sequenza analizzata.

4.8.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'infiammazione è un meccanismo di difesa innato che si innesca a seguito di un danno a cellule o tessuti per l'azione di insulti locali di diversa natura. La risposta infiammatoria è di fondamentale importanza per la protezione dell'organismo, ma se si realizza in maniera inappropriata può risultare deleteria (Gruys *et al.*, 2005). Dall'attivazione esuberante della risposta innata deriva infatti una massiva reazione sistemica contraddistinta da ipotensione, alterazione della temperatura corporea, tachicardia e depressione del sensorio che caratterizzano la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS). Quando tale sindrome si verifica a seguito di un'infezione viene definita Sepsis (Bone *et al.*, 1997). Quest'ultima rappresenta una delle principali cause di mortalità nelle unità di terapia intensiva moderne per la mancanza di strategie terapeutiche specifiche ed efficaci. Nonostante l'identificazione di nuovi e promettenti approcci terapeutici, attualmente, ai fini di ridurre la mortalità conseguente alla disfunzione multiorganica secondaria alla Sepsis, è fondamentale pervenire precocemente ad una diagnosi del processo morboso in atto, considerata l'inefficacia anche delle terapie più specifiche, se iniziate tardivamente.

Ad oggi, però, manca un reale *gold standard* per la diagnosi di Sepsis, vista la complessità e la parziale conoscenza dei meccanismi patogenetici di tale condizione. I parametri clinici proposti per la diagnosi della suddetta sindrome risultano infatti indici inaccurati ed aspecifici. Per poter meglio studiare la Sepsis nei suoi diversi aspetti è stato proposto un sistema di classificazione, denominato "PIRO" che prende in considerazione 4 fattori in grado di condizionare l'avvio e l'evoluzione di tale sindrome. In particolare vengono valutati elementi propri dell'ospite, caratteristiche dell'insulto esterno, il tipo di risposta che si instaura e il grado di disfunzione organica che ne può derivare.

Data la mancanza di specificità dei parametri clinici proposti, si è deciso di valutare altri elementi che meglio riflettono la risposta dell'ospite, quali variabili infiammatorie ed emodinamiche. In questo contesto ha trovato una crescente applicazione l'utilizzo di *biomarker*, ossia fattori misurabili nel sangue o in campioni biologici, in grado di identificare la patologia in oggetto (Levy *et al.*, 2003).

I marker più studiati sono rappresentati da molecole rilasciate e misurabili in circolo in risposta alla SIRS, tra cui: le citochine, proteine a basso peso molecolare di origine proteica o glicoproteica, che intervengono nella regolazione e modulazione della risposta infiammatoria, le proteine di fase acuta, prodotte dal fegato nell'ambito della cosiddetta "risposta di fase acuta" e, più recentemente, la procalcitonina (PCT), proteina precursore della calcitonina (CT). Tale molecola deriva dalla trascrizione del gene CALC-I e viene normalmente sintetizzata nelle cellule C della tiroide all'interno delle quali subisce un clivaggio enzimatico originando l'ormone maturo, la calcitonina (CT). La PCT è stata rilevata in quantità significativamente elevata nel plasma di pazienti settici (Assicot *et al.*, 1993) e la presenza di concentrazioni analoghe in pazienti tiroidectomizzati ha suggerito un'origine extratiroidea di questo peptide (Nishikura, 1999).

Diversi studi hanno dimostrato l'espressione tissutale ubiquitaria del CALC-I in modelli animali di Sepsis come la cavia (Muller *et al.*, 2001), il suino (Wagner *et al.*, 2002) e il babuino (Morgenthaler *et al.*, 2003).

Nel nostro studio sperimentale si è deciso di valutare l'espressione genica dei suddetti marker nei tessuti di cani affetti da parvovirosi. Tale patologia risulta infatti un valido modello di Sepsis ad insorgenza spontanea per la traslocazione batterica conseguente alla grave alterazione della mucosa intestinale indotta dal virus e successiva setticemia (Otto, 2007). Accanto alla popolazione di parvovirofici, si è deciso di studiare un secondo gruppo di cani che mostravano un quadro clinico di SIRS. Tali soggetti, data l'assenza di uno strumento accurato per la diagnosi di SIRS/Sepsis, sono stati selezionati sulla base dei classici parametri clinici, portando all'inclusione di pazienti con un quadro eterogeneo di patologie a carattere infiammatorio. In

particolare in alcuni soggetti parvovirofici non erano presenti almeno 2 dei parametri richiesti, nonostante i cani fossero deceduti a seguito delle complicazioni della SIRS, confermando ulteriormente il limite di tali criteri .

L'obiettivo principale del nostro lavoro è stato quello di verificare se il gene CALC-I fosse espresso in sede extra-tiroidea nel cane, come riportato in letteratura per altre specie.

E' stato dimostrato che la sintesi di PCT può essere indotta da citochine quali IL-1 β e TNF- α (Linscheid *et al.*, 2003). Per questo si è deciso di valutare se l'espressione del CALC-I fosse correlata a quella dei geni codificanti tali molecole. Nel nostro studio abbiamo scelto tre citochine di fase acuta, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , coinvolte nell'induzione della risposta infiammatoria attraverso l'attivazione di diversi mediatori di flogosi.

I tessuti testati includevano la tiroide, organo in cui avviene fisiologicamente l'espressione del CALC-I, il polmone, milza e fegato che sono stati scelti sulla base dei riferimenti bibliografici attinenti all'espressione del suddetto gene (Muller *et al.*, 2001).

La raccolta dei campioni è stata effettuata in sede autoptica e i tessuti sono stati stoccati immediatamente a -80°C, vista l'instabilità e la rapida degradabilità dell'RNA (Medeiros *et al.*, 2007).

L'estrazione dell'RNA dai tessuti è stata effettuata impiegando due metodiche, una tradizionale che utilizza una miscela di fenolo e guanidina isotiocianato, la seconda impiegando un kit commerciale a colonnine. La prima di queste permette di ottenere RNA con una maggior purezza, ma in quantitativi inferiori rispetto alla seconda che è stata utilizzata infatti nel caso in cui si fossero ottenuti quantitativi estremamente ridotti tali da inficiare i risultati delle reazioni di amplificazione.

Sono stati messi a punto diversi protocolli di RT-PCR in due step per l'amplificazione dei geni target. I *primers* utilizzati si sono rivelati appropriati per l'amplificazione genica eccetto per TNF- α dove si è evidenziata la presenza di un prodotto aspecifico in diversi organi testati.

La PCR per CALC-I è stata effettuata utilizzando la *Taq* Titanium, una DNA polimerasi diversa rispetto a quella utilizzata per le citochine, in quanto ha fornito le rese migliori con bande specifiche a maggiore intensità.

Dai risultati ottenuti risulta confermata l'espressione fisiologica del gene CALC-I in sede tiroidea in tutti i casi considerati e si è evidenziata un'espressione extra-tiroidea del suddetto gene in diversi tessuti analizzati, con maggior frequenza nella milza.

Nel soggetto sano, invece, la positività per l'espressione genica è stata riscontrata solo nella tiroide. Questo riscontro potrebbe indicare e confermare che in corso di infiammazione sistemica il gene CALC-I viene espresso in cellule di organi parenchimosi.

Non è stata rilevata un'espressione ubiquitaria, ma si tratta di una valutazione qualitativa preliminare che richiede una conferma attraverso una quantificazione dell'espressione genica tramite Real-time PCR. Quest'ultima metodica è infatti più sensibile essendo in grado di rilevare quantitativi ridotti di materiale genomico che possono non essere valutati con una PCR di tipo qualitativo.

Un limite della metodica è legato alla rapida degradazione dell'RNA: nonostante gli organi prelevati in sede autoptica siano stati immediatamente stoccati a -80°C, è possibile che i ripetuti congelamenti/scongeliamenti a cui i tessuti sono stati sottoposti per la processazione degli stessi, abbiano contribuito alla degradazione di parte dell'RNA, comportando risultati falsi negativi. In futuro, nell'ottica di una messa a punto della Real-time sarà necessario uniformare sia il metodo di estrazione che la manipolazione del campione, per poter valutare in maniera assoluta l'espressione genica. Sicuramente sarà necessario ampliare la casistica, sia ai soggetti affetti da parvovirosi che da altre patologie a carattere infiammatorio, per poter confermare questi dati preliminari, valutando la possibilità di utilizzare criteri di inclusione più accurati quali proteine di fase acuta o parametri dell'emostasi. In particolare si rende necessaria una popolazione di cani sani di controllo per poter confermare che l'espressione extra-tiroidea del gene CALC-I sia indotta da uno stato di flogosi anche nel cane. Tale possibilità avvalorerebbe ulteriori studi

quali la ricerca della PCT nel plasma che permetterebbe una rapida diagnosi *in vivo*. Inoltre può essere interessante testare altri tessuti per valutare se si verificano comportamenti particolari nell'espressione del CALC-I in determinati organi.

L'espressione genica delle citochine è stata rilevata in più tessuti ed anche in questo caso non si è evidenziata un'espressione ubiquitaria.

Nel caso delle citochine si rende ancor più necessaria una valutazione di tipo quantitativo poiché l'espressione in determinati organi può avvenire fisiologicamente. In letteratura esistono solo poche pubblicazioni relative all'espressione di queste citochine nei tessuti di cane e nessuna in corso di parvovirosi. Studi precedenti hanno rilevato, tramite Real-time, l'espressione genica di un panel citochinico, incluse le citochine da noi valutate, nel polmone e nel duodeno di soggetti sani (Peeters *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2005). In tessuti patologici è invece documentata un'espressione di TNF- α nella milza di cani affetti da *Leishmania chagasi* (Lage *et al.*, 2007) e nel fegato in seguito all'esposizione ad inquinanti ambientali (Sonne *et al.*, 2007). L'espressione relativa all'IL-6 è stata dimostrata *in vitro* in miocardiociti di cane a seguito dell'induzione con IL-1 β , TNF- α ed LPS. I miocardiociti sono stati ottenuti dal cuore di cani in cui era stato indotto un periodo di ischemia e successiva riperfusione (Gwechenberger *et al.*, 1999). L'mRNA di IL-1 β è stato rilevato su biopsie gastriche di cani con gastrite (Wiinberg *et al.*, 2005) e quello relativo a TNF- α in biopsie nasali di cani con Aspergillosi (Peeters *et al.*, 2006).

L'espressione per IL-6 e TNF- α è stata rilevata per la maggior parte dei casi nelle milze, mentre quella dell'IL-1 β è stata rilevata in tutti gli 11 fegati.

Dai nostri dati preliminari, non risulta esserci una correlazione tra espressione del CALC-I e dei geni relativi alle diverse citochine, se non in alcuni casi ed in organi diversi.

Come per la procalcitonina, la messa a punto di una Real-time consentirebbe di verificare la possibilità di stabilire un valore di *cut-off* per discriminare tra pazienti con SIRS e non. La sindrome da risposta infiammatoria sistemica è caratterizzata dall'azione di un ampio numero di citochine, con ruoli sia pro-infiammatori che modulatori anti-infiammatori. Nel nostro studio sono state prese in considerazione citochine ad attività prevalentemente infiammatoria, ma un ampliamento del panel citochinico, che comprenda citochine ad azione modulatore quali IL-4 ed IL-10, potrebbe indicare informazioni importanti per la caratterizzazione della risposta dell'ospite.

La risposta immunitaria che si realizza in corso di Parvovirosi canina è stata ben caratterizzata per quanto riguarda l'immunità umorale, ma l'immunità cellulo-mediata non è stata ancora indagata. Il diverso comportamento clinico delle varianti 2a e 2b rispetto allo stipo originario, caratterizzato da periodo di incubazione più breve, necessità di una minore carica infettante e sintomatologia più grave (Decaro *et al.*, 2005), potrebbe essere legato ad una particolare risposta dell'ospite.

Infine, la banda aspecifica rilevata nel corso della PCR per TNF- α è stata ricondotta all'espressione del gene relativo al precursore della componente 2 del complemento. Quest'ultimo è un elemento fondamentale della risposta immunitaria e l'evidenza dell'espressione di un suo fattore in diversi organi può essere un indice dell'attivazione sistemica della risposta innata in corso di SIRS. La presenza del prodotto di amplificazione aspecifico suggerisce che la coppia di primer scelta per rilevare l'espressione del TNF- α non è idonea e sarà necessario disegnarne una nuova.

Per concludere, questo studio rappresenta la prima segnalazione nel cane dell'espressione del gene CALC-I in tessuti extratiroidi.

In futuro ci proponiamo di analizzare quantitativamente tale espressione genica: il confronto tra la quantità di RNA trascritto in tessuti di soggetti sani e patologici permetterà di verificare se la procalcitonina può essere un valido marker per la diagnosi di SIRS/Sepsis. Inoltre, in letteratura viene riportata la possibile espressione del CALC-I da parte dei monociti (Linscheid *et al.*,

2004); poichè tali cellule rappresentano un'interessante matrice di studio per la possibilità di effettuare valutazioni *in vivo*, per il futuro intendiamo includere nelle analisi, oltre ai tessuti, gli stessi monociti.

Oltre al CALC-I, sarà interessante quantificare l'espressione genica delle citochine per dimostrare se, in corso di SIRS, esiste una maggior espressione di tali geni nei diversi tessuti.

In questo modo sarà possibile avere una visione più ampia e articolata dei meccanismi immunitari in gioco in corso di SIRS ed in particolare in corso di parvovirosi che si è confermata essere un valido modello di studio della suddetta sindrome.

5. CONCLUSIONI FINALI

L'insieme dei risultati raccolti sull'espressione citochinica nei diversi studi sperimentali approntati *in vitro* e *in vivo* confermano anche in ambito veterinario il ruolo che tali mediatori rivestono nella modulazione e regolazione della risposta immunitaria dell'ospite.

In particolare la valutazione di marker di infiammazione e sepsi quali sono le citochine ha permesso una maggior comprensione della patogenesi in corso di *Recurrent Airway Obstruction* del cavallo, sepsi del puledro, infezioni da *Virus della Diarrea Virale Bovina* e infezioni da *Parvovirus* nel cane. Si sono esaminati in tal modo gli effetti che tali patologie possono esercitare sul profilo immunitario dell'ospite mediante analisi dell'espressione di questi mediatori.

Come dimostrato da sperimentazioni con animali da laboratorio, alcune patologie a carico del sistema respiratorio e del sistema nervoso possono essere attenuate o addirittura annullate mediante blocco della cascata di produzione citochinica conseguente all'evento flogistico.

Inoltre la valutazione *in vitro* dell'espressione di citochine in cellule deputate a rispondere *in vivo* a stimoli infiammatori di natura esogena, come gli agenti patogeni, o endogeni, come avviene in corso di patologie autoimmuni, può rappresentare un modello di studio dell'azione esercitata da queste durante la risposta immunitaria.

Ciò è stato valutato mediante l'uso di linfociti coltivati in presenza di diversi ceppi di *St. aureus* isolati da latte di vacche affette da mastite e con diversi sottoprodotti del colostro bovino.

Nel primo caso si è dimostrata una diversa espressione di citochine sulla base delle enterotossine prodotte a giustificare un differente comportamento del patogeno in sede mammaria. Nel secondo caso cellule derivanti da midollo osseo incubate con linfociti murini in presenza di diversi sottoprodotti colostrali hanno mostrato una diversa espressione di marker di superficie di interesse immunitario, una differente proliferazione e un modificato profilo citochinico.

Una maggior comprensione dei meccanismi di espressione delle citochine potrà portare all'acquisizione di ulteriori informazioni riguardo la risposta immunitaria attuata in diverse patologie animali, contribuendo a chiarirne le basi patogenetiche.

In particolare il blocco della produzione di citochine, l'inibizione o la catalizzazione del legame al rispettivo recettore e l'inibizione del meccanismo di trasduzione del segnale potrebbero rappresentare innovative strategie terapeutiche in ambito veterinario.

6. BIBLIOGRAFIA

- AALTO H., TAKALA A., KAUTIAINEN H., SIITONEN S., REPO H. (2007). Monocyte CD14 and soluble CD14 in predicting mortality of patients with severe community acquired infection. *Scand J Infect Dis.*; **39**: 569-603.
- ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., POBER J.S. (2000). *Cellular and molecular immunology*, 4th edition by W.B.Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- ABDEL-MEGID S., SHIEH H.-S., SMITH W., DAYRINGER H., VIOLAND B., BENTLE L. (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **86**: 6434-6437.
- ABED N.S., CHACE J.H., COWDERY J.S. (1994a). T cell-independent and T cell-dependent B cell activation increases IFN γ R expression and renders B cells sensitive to IFN γ -mediated inhibition. *J. Immunol.*; **153**: 3369-3377.
- ABED N.S., CHACE J.H., FLEMING A.L., COWDERY J.S. (1994b). Interferon- γ regulation of B lymphocyte differentiation: activation of B cells is a prerequisite for IFN γ -mediated inhibition of B cell differentiation. *Cell. Immunol.*; **153**: 356-366.
- ABRAHAM E., WUNDERINK R., SILVERMAN H., PERL T.M., NASRAWAY S., LEVY H., BONE R., WENZEL R.P., BALK R., ALLREAD R., PENNINGTON J.E., WHERRY J.C. (1995). Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome: a randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *JAMA*; **273**: 934-941.
- ABRAHAM E., ANZUETO A., GUTIERREZ G., TESSLER S., SAN PEDRO G., WUNDERINK R., DAL NOGARE A., NASRAWAY S., BERMAN S., COONEY R., LEVY H., BAUGHMAN R., RUMBAK M., LIGHT R.B., POOLE L., ALLRED R., CONSTANT J., PENNINGTON J., S. PORTER. (1998). Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*; **351**: 929-933.
- ABRAHAMSOHN I.A., COFFMAN R.L. (1996). Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF α , IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp. Parasitol.*; **84**: 231-244.
- ADLER H., JUNGI T.W., PFISTER H., STRASSER M., SILEGHEM M., PETERHANS E. (1996). Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *J Virol.*; **70** (4): 2650-2653.
- AGARWAL S., RAO A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity*; **9**: 765-775.
- AGGARWAL B.B., KHOR W.J., HASS MOFFAT B., SPENCER S.A., HENZEL W.J., BRINGMAN T.S., NEDWIN G.E., GOEDDEL D.V., HARKINS R.N. (1985b). Human tumor necrosis factors: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.*; **260**: 2345.
- AGGARWAL B.B., EESSALU T.E., HASS P.E. (1985c). Characterization of receptor for human tumor necrosis factor and their regulation by interferon. *Nature*; **318**: 665-667.
- AGGARWAL B.B., EESSALU T.E. (1987). Induction of receptors for tumor necrosis factor- α by interferons is not a major mechanism for their synergistic cytotoxic response. *J. Biol. Chem.*; **262**: 10000-10007.
- AGGARWAL B.B., VILCEK J. (1992). *Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action*, Marcel Dekker Editions, New York.
- AHLIN A., ELINDER G., PALMBLAD J. (1997). Dose-dependent enhancements by interferon- γ on functional responses of neutrophils from chronic granulomatous disease patients. *Blood*; **89**: 3396-3401.
- AINSWORTH D.M., GRÜNIG G., MATYCHAK M.B., YOUNG J., WAGNER B., ERB H.N., ANTCZAK D.F. (2003). Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immun. Immunopath.*; **96**: 83-91.

- AIRD W.C. (2003). The role of endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*; **101**: 3765-3777.
- AKDIS C.A., BLESKEN T., AKDIS M., WUTHRICH B., BLASER K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.*; **102**: 98-106.
- AKIRA S., YOSHIDA K., TANAKA T., TAGA T., KISHIMOTO T. (1995). Targeted disruption of the IL-6 related genes: gp130 and NF-IL-6. *Immunol. Rev.*; **148**: 221.
- ALBINA J.E., ABATE J.A., HENRY W.L. J. (1991). Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN γ in the induction of nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol.*; **147**: 144-148.
- ALEXOPOULOU L., PASPARAKIS M., KOLLIAS G.A. (1997). Murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF α) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF α receptor signaling. *Eur. J. Immunol.*; **27**: 2588-2592.
- ALHEIM K., CHAI Z., FANTUZZI G., HASANVAN H., MALINOWSKY D., DI SANTO E., GHEZZI P., DINARELLO C.A., BARTFAI T. (1997). Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1 α and IL-1 β beta, and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels, in IL-1 β beta-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci USA*; **94**: 2681-2686.
- AL-JANADI M., AL-DALAAN A., AL-BALLA S., AL-HUMAIIDI M., RAZIUDDIN S. (1996). Interleukin-10 (IL-10) secretion in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: IL-10-dependent CD4⁺ CD45RO⁺ T cell-B cell antibody synthesis. *J. Clin. Immunol.*; **16**: 198-207.
- ALLAVENA P., PIEMONTE L., LONGONI D., BERNASCONI S., STOPPACCIARO A., RUCO L., MANTOVANI A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.*; **28**: 359-369.
- ALNEMRI E.S., LIVINGSTON D.J., NICHOLSON D.W., SALVESEN G., THORNBERRY N.A., WONG W.W., YUAN J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*; **87**: 123.
- ALOISI F., BORSELLINO G., SAMOGGIA P. (1992). Astrocyte cultures from human embryonic brain: characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *J. Neurosci. Res.*; **32**: 494-506.
- ALONZI T., FATTORI E., LAZZARO D., COSTA P., PROBERT L., KOLLIAS G., DE BENEDETTI F., POLI V., CILIBERTO G. (1998). Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.*; **187**: 461-468.
- ALZONA M., JÄCK H.-M., FISHER R.I., ELLIS T.M. (1994). CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN- γ and IL-5 and exhibit enhanced B cell helper activity. *J. Immunol.*; **153**: 2861-2867.
- ANDREWS H.J., BUNNING R.A., DINARELLO C.A., RUSSELL R.G. (1989). Modulation of human chondrocyte metabolism by recombinant human interferon gamma: in vitro effects on basal and IL-1 β -stimulated proteinase production, cartilage degradation and DNA synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*; **1012**: 128-134.
- ANDREWS H.J., BUNNING R.A., PLUMPTON T.A., CLARK I.M., RUSSELL R.G., CAWSTON T.E. (1990). Inhibition of interleukin-1-induced collagenase production in human articular chondrocytes in vitro by recombinant human interferon-gamma. *Arthritis Rheum.*; **33**: 1733-1738.
- ANDUS T., GEIGER T., HIRANO T., NORTHOFF H., GANTER U., BAUER J., KISHIMOTO T., HEINRICH P.C. (1987). Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett.*; **221**: 18-22.
- ANTONI G., PRESENTINI R., PERIN F., TAGLIABUE A., GHIARA P., CENSINI S., VOLPINI G., VILLA L., BORASCHI D. (1986). A short synthetic peptide fragment of human interleukin 1 with immunostimulatory but not inflammatory activity. *J. Immunol.*; **137**: 3201-3204.

- ANTONI G., PRESENTINI R., PERIN F., NENCIONI L., VILLA L., CENSINI S., GHIARA P., VOLPINI G., BOSSU P., TAGLIABUE A., BOARSCHI D. (1989). Interleukin 1 and its synthetic peptides as adjuvants for poorly immunogenic vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.*; **251**: 153–160.
- AOYAMA T., PETERS J. M., IRITANI N., NAKAJIMA T., FURIHATA K., HASHIMOTO T., GONZALEZ F. J. (1998). Altered constitutive expression of fattyacid- metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator receptor α . *J. Biol. Chem.*; **273**: 5678–5684.
- APPARAILLY F., VERWAERDE C., JACQUET C., AURIAULT C., SANY J., JORGENSEN C. (1998). Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.*; **160**: 5213–5220.
- ARAD G., LEVY R., HILLMAN D., KAEMPFER R. (2000). Superantigen antagonist protects against lethal shock and defines a new domain for T-cell activation. *Nat Med.*; **6**: 414–421.
- AREND W.P., MALYAK M., GUTHRIDGE C.J., GABAY C. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.*; **16**: 27–55.
- ARMITAGE R.J. (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr. Opin. Immunol.*; **6**: 407–413.
- AROCK M., ZUANY-AMORIM C., SINGER M., BENHAMOU M., PRETOLANI M. (1996). Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur. J. Immunol.*; **26**: 166–170.
- ASANO S., OKANO A., OZAWA K., NAKAHATA T., ISHIBASHI T., KOIKE K., KIMURA H., TANIOKA Y., SHIBUYA A., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1990). In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood*; **75**: 1602–1605.
- ASHRAF M., MURAKAMI M., KUDO I. (1996). Cross-linking of the high-affinity IgE receptor induces the expression of cyclo-oxygenase 2 and attendant prostaglandin generation requiring interleukin 10 and interleukin 1 beta in mouse cultured mast cells. *Biochem. J.*; **320**: 965–973.
- ASSICOT M., GENDREL D., CARSIN H., RAYMOND J., GUILBAUD J., BOHUON C. (1993). High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.*; **341**: 515–518.
- ASTALDI G.C., JANSSEN M.C., LANSDORP P., WILLEMS C., ZEIJLEMAKER W.P., OOSTERHOF F. (1980). Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas. *J. Immunol.*; **125**: 1411–1444.
- ASTE-AMEZAGA M., MA X., SARTORI A., TRINCHIERI G. (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol.*; **160**: 5936–5944.
- AUPHAN N., DIDONATO J.A., ROSETTE C., HELMBERG A., KARIN M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science*; **270**: 286–290.
- BAKER D., BUTLER D., SCALLON B.J., O'NEILL J.K., TURK J.L., FELDMANN M. (1994). Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumour necrosis factor activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF α receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur. J. Immunol.*; **24**: 2040–2048.
- BAKER P.E., GILLIS S., FERM M.M., SMITH K.A. (1978). The effect of T cell growth factor on the generation of cytolytic T cells. *J. Immunol.*; **121**: 2168–2173.
- BAKOUCHE O., BROWN D.C., LACHMAN L.B. (1987). Subcellular localization of human monocyte interleukin 1: evidence for an inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL 1 release. *J. Immunol.*; **138**: 4249–4255.
- BALASA B., SARVETNICK N. (1996). The paradoxical effects of interleukin 10 in the immunoregulation of autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.*; **9**: 283–286.
- BALDWIN E.T., FRANKLIN K.A., APPELLA E. (1990). Crystallization of human interleukin-8. A protein chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*; **265**: 6851–6853.

- BALDWIN E.T., WEBER I.T., CHARLES R. (1991). Crystal structure of interleukin 8 : Symbiosis of NMR and crystallography. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **88**: 502–506.
- BALENTINE J.D. (1985). Hypotheses in spinal cord trauma research. In Becker DP, Povlishock JT, (eds.): *Central Nervous System Trauma Status Report*: Bethesda, Md: NIH, 455-461.
- BARGETZI M.J., LANTZ M., SMITH C.G., TORTI F.M., OLSSON I., EISENBERG S.P., STARNES H.F. (1993). Interleukin-1 beta induces interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding proteins. *Cancer Res.*; **53**: 4010–4013.
- BARNA B.P., CHOU S.M., JACOBS B., YEN-LIEBERMAN B., RANSOHOFF, R.M. (1989). Interferon- γ impairs induction of HLA-DR antigen expression in cultured adult human astrocytes. *J. Neuroimmunol.*; **23**: 45–53.
- BARRETT M.P., TETAUD E., SEYFANG A., BRINGAUD F., BALTZ T. (1995). Functional expression and characterization of the Trypanosoma brucei procyclic glucose transporter, THT2. *Biochem J.*; **312** (3): 687-91.
- BARRINGTON R., ZHANG M., FISCHER M., CARROL M.C., (2001). The role of complement in inflammation and adaptative immunity. *Immunological Reviews*; **180**: 5-15.
- BATAILLE R., JOURDAN M., ZHANG X.G., KLEIN B. (1989). Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J. Clin. Invest.*; **84**: 2008–2011.
- BAUER M. K., VOGT M., LOS M., SIEGEL J., WESSELBORG S., SCHULZE- OSTHOFF K. (1998). Role of reactive oxygen intermediates in activationinduced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J. Biol. Chem.*; **273**: 8048–8055.
- BAZAN J.F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today*; **11**: 350–354.
- BAZAN J.F. (1992). Unraveling the structure of IL-2. *Science*; **257**: 410–413.
- BEADLE R.E., HOROHOV D.W., GAUNT S.D. (2002). Interleukin-4 and interferon gamma gene expression in summer pasture associated- obstructive pulmonary disease affected horses. *Equine vet. J.*; **34**: 389-394.
- BEAGLEY K.W., ELDRIDGE J.H., LEE F., KIYONO H., EVERSON M.P., KOOPMAN W.J., HIRANO T., KISHIMOTO T., MCGHEE J.R. (1989). Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med.*; **169**: 2133–2148.
- BEAMAN M.H., HUNTER C.A., REMINGTON J.S. (1994). Enhancement of intracellular replication of Toxoplasma gondii by IL-6: interactions with IFN- γ and TNF- α . *J. Immunol.*; **153**: 4583–4587.
- BECKER J.C., CZERNY C., BROCKER E.B. (1994). Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. *Int. Immunol.*; **6**: 1605–1612.
- BECKMAN J.S.: (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*; **9**: 866-844.
- BEHNKE J.M., WAHID F.N., GRENCIS R.K., ELSE K.J., BEN S.A., GOYAL P.K. (1993). Immunological relationships during primary infection with Heligmosomoides polygyrus (Nematospiroides dubius): downregulation of specific cytokine secretion (IL-9 and IL-10) correlates with poor mastocytosis and chronic survival of adult worms. *Parasite Immunol.*; **15**: 415–421.
- BEJARANO M.T., DE W.M.R., ABRAMS J.S., BIGLER M., BACCHETTA R., DE V.J., RONCAROLO M.G. (1992). Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int. Immunol.*; **4**: 1389–1397.
- BELLINGAN G. (1999). Inflammatory cell activation in sepsis. *British Medical Bulletin.*; **55**: 12-29.
- BELLINGAN G. (2003). Apoptosis and the resolution of inflammation in sepsis. In Vincent J., Carlet J., Opal S.M.: *The Sepsis Text, Kluwer Academic Publishers*, pag.231-242.

- BELOSEVIC M., DAVIS C.E., MELTZER M.S., NACY C.A. (1988). Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN- γ for induction of resistance to infection. *J. Immunol.*; **141**: 890–896.
- BELOSEVIC M., FINBLOOM D.S., VAN DER MEIDE P.H., SLAYTER M.V., NACY C.A. (1989). Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J. Immunol.*; **143**: 266–274.
- BENCZIK M., GAFFEN S.L. (2004). The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest.*; **33**(2): 109–42.
- BENDELE A., MCABEE T., SENNELLO G., FRAZIER J., CHLIPALA E., MCCABE D. (1999). Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. *Arthritis Rheum.*; **42**: 498–506.
- BENDTZEN K., BUSCHARD K., DIAMANT M., HORN T., SVENSON M. (1989). Possible role of IL-1, TNF- α , and IL-6 in insulin-dependent diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease. *Lymphokine Res.*; **8**: 335–340.
- BENYOUCEF S., HOBER D., SHEN L., AJANA F., DE GROOTE D., GERARD Y., LION G., VERMESCH A., BOCKET-MOUTON L., MOUTON Y., WATTRE P. (1996). TNF α production by whole blood from HIV-1 infected patients. *Pathol. Biol.*; **44**: 393–396.
- BERG D.J., KUHN R., RAJEWSKY K., MULLER W., MENON S., DAVIDSON N., GRUNIG G., RENNICK D. (1995a). Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J. Clin. Invest.*; **96**: 2339–2347.
- BERG D.J., DAVIDSON N., KUHN R., MULLER W., MENON S., HOLLAND G., THOMPSON-SNIPES L., LEACH M.W., RENNICK D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.*; **98**: 1010–1020.
- BERKMAN N., JOHN M., ROESEMS G., JOSE P.J., BARNES P.J., CHUNG K.F. (1995). Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 α expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.*; **155**: 4412–4418.
- BERNER R., TÜXEN B., CLAD A., FORSTER J., BRANDIS M. (2000). Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection. *Eur J Pediatr.*; **159**(3): 205–10.
- BERNER R., CSORBA J., BRANDIS M. (2001). Different cytokine expression in cord blood mononuclear cells after stimulation with neonatal sepsis or colonizing strains of *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr Res.*; **49**(5): 691–7.
- BERTINI R., BIANCHI M., GHEZZI P. (1988). Adrenalectomy sensitizes to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*; **167**: 1708–1712.
- BHARDWAJ N., SANTHANAM U., LAU L.L., TATTER S.B., GHAYEB J., RIVELIS M., STEINMAN R.M., SEHGAL P.B., MAY L.T. (1989). IL-6/IFN- β 2 in synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. Identification of several isoforms and studies of cellular sources. *J. Immunol.*; **143**: 2153–2159.
- BILLIAU A., VANDEKERCKHOVE F. (1991). Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur. J. Clin. Invest.*; **21**: 559–573.
- BILLIAU A., MATTHYS P. (1992). Interferon- γ , more of a cachectin than tumor necrosis factor. *Cytokine*; **4**: 259–263.
- BILLIAU A., (1996). Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv. Immunol.*; Volume: **62**, 61–130.
- BIX M., LOCKSLEY R.M. (1998). Independent and epigenetic regulation of the IL-4 alleles in CD4+ T cells. *Science*; **281**: 1352–1354.

- BLACK R.A., KRONHEIM S.R., CANTRELL M., DEELEY M.C., MARCH C.J., PRICKETT K.S., WIGNALL J., CONLON P.J., COSMAN D., HOPP T.P. (1988). Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J. Biol. Chem.*; **263**: 9437–9442.
- BLACK R.A., WHITE J.M. (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin. Cell Biol.*; **10**: 654–659.
- BLEIJS D.A., DE WAAL MALEFYT R., FIGDOR C.G., VAN KOOYK Y. (1999). Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF α -alpha cytokine profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur. J. Immunol.*; **29**: 2248–2258.
- BLIGHT A.R. (1992). Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma*; **1**: 83-91.
- BOCCADORO M., BATTAGLIO S., OMEDE P., PALUMBO A.P., FUSARO A., FRIERI L., GALLONE G., POLLONI R., MOSSO R., DE FILIPPI P.G. (1991). Increased serum neopterin concentration as indicator of disease severity and poor survival in multiple myeloma. *Eur J Haematol.*; **47**: 305-309.
- BOCHSLER O.N., SLAUSON D.O. (2002). Inflammation and repair tissue. In *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology* 3rd edition by Mosby, Inc. pag. 143.
- BOEHM U., KLAMP T., GROOT M., HOWARD J.C. (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.*; **15**: 749–775.
- BOGEN S.A., FOGELMAN I., ABBAS A.K. (1993). Analysis of IL-2, IL-4, and IFN- γ -producing cells in situ during immune responses to protein antigens. *J. Immunol.*; **150**: 4197–4205.
- BOISSIER M.-C., CHIOCCHIA G., BESSIS N. *et al.* (1995). Biphasic effect of interferon- γ in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.*; **25**: 1184–1190.
- BONDER C.S., FINLAY-JONES J.J., HART P.H. (1999). Interleukin-4 regulation of human monocyte and macrophage interleukin-10 and interleukin-12 production. Role of a functional interleukin-2 receptor gamma-chain. *Immunology*; **96**: 529–536.
- BONDESON J., BROWNE K.A., BRENNAN F.M., FOXWELL B.M., FELDMANN M. (1999). Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IB into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-B independent. *J. Immunol.*; **162**: 2939–2945.
- BONE R.C., BALK R.A., CERRA F.B., DELLINGER R.P., FEIN A.M., KNAUS W.A., SCHEIN R.M., SIBBAD W.J. (1992). ACCP/SCCM Consensus conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.*; **101**: 1644-1655.
- BONE R.C., GRODZIN C.J., BALK R.A. (1997). Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.*; **112**: 235-243.
- BORASCHI D., CENSINI S., TAGLIABUE A. (1984). Interferon- γ reduces macrophage-suppressive activity by inhibiting prostaglandin E2 release and inducing interleukin 1 production. *J. Immunol.*; **133**: 764–768.
- BORASCHI D., NENCIONI L., VILLA L., CENSINI S., BOSSU P., GHIARA P., PRESENTINI R., PERIN F., FRASCA D., DORIA G., TAGLIABUE A. (1988). In vivo stimulation and restoration of the immune response by the noninflammatory fragment 163–171 of human interleukin 1 beta. *J. Exp. Med.*; **168**: 675–686.
- BORASCHI D., VILLA L., VOLPINI G., BOSSÙ P., CENSINI S., GHIARA P., SCAPIGLIATI G., NENCIONI L., BARTALINI M., MATTEUCCI G. (1990). Differential activity of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in the stimulation of the immune response in vivo. *Eur J Immunol*; **20**: 317–321.
- BORASCHI D., GHIARA P., SCAPIGLIATI G., VILLA L., SETTE A., TAGLIABUE A. (1992). Binding and internalization of the 163–171 fragment of human IL-1 β beta. *Cytokine*; **4**: 201–204.
- BOT F.J., VAN EIJK L., BROEDERS L., AARDEN L.A., LOWENBERG B. (1989). Interleukin-6 synergizes with M-CSF in the formation of macrophage colonies from purified human marrow progenitor cells. *Blood*; **73**: 435–437.

- BOURRIE B., BOUABOULA M., BENOIT J.M., DEROCQ J.M., ESCLANGON M., LE FUR G., CASELLAS P. (1995). Enhancement of endotoxin-induced interleukin-10 production by SR 31747A, a sigma ligand. *Eur J. Immunol.*; **25**: 2882–2887.
- BOWLES K.S., BEADLE R.E., MOUCH S., POURCIAU S.S., LITTLEFIELD-CHABAUD M.A., LE BLANC C., MISTRIC L., FERMAGLICH D., HOROHOV D.W. (2002). A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immun. Immunopath.*; **87**: 385-389.
- BRAKENHOFF J.P., DE HON F.D., FONTAINE V., TEN BOEKEL E., SCHOOLTINK H., ROSE JOHN S., HEINRICH P.C., CONTENT J., AARDEN L.A. (1994). Development of a human interleukin-6 receptor antagonist. *J. Biol. Chem.*; **269**: 86–93.
- BRANDHUBER B., BOONE T., KENNEY W., MCKAY D. (1987). Three-dimensional structure of interleukin-2. *Science*; **238**: 1707–1709.
- BRANDT S., BODINE D.M., DUNBAR C.E., NIENHUIS A. (1990). Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice. *J. Clin. Invest.*; **86**: 592–599.
- BREATHNACH C.C., STURGILL-WRIGHT T., STILTNER J.L., ADAMS A.A., LUNN D.P., HOROHOV D.W. (2006). Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Vet Immunol Immunopathol.*; **112(3-4)**: 199-209.
- BREDER C.D., DINARELLO C.A., SAPER C.B. (1988). Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science*; **240**: 321–324.
- BRENNAN F.M., CHANTRY D., JACKSON A., MAINI R., FELDMANN M. (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*; **2**: 244–247.
- BRENNAN F.M., ZACHARIAE C.O., CHANTRY D. (1990). Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur. J. Immunol.*; **20**: 2141–2144.
- BREWER B.D., KOTERBA A.M. (1988). Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis. *Equine Vet J.*; **20(1)**: 18-22.
- BREWER B.D., KOTERBA A.M., CARTER R.L., ROWE E.D. (1988). Comparison of empirically developed sepsis score with a computer generated and weighted scoring system for the identification of sepsis in the equine neonate. *Equine Vet J.*; **20(1)**: 23-4.
- BRIERE F., BRIDON J.M., CHEVET D., SOUILLET G., BIENVENU F., GURET C., MARTINEZ-VALDEZ H., BANCHEREAU J. (1994a). Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J. Clin. Invest.*; **94**: 97–104.
- BRIX S., MAGYAR O.H., BARKHOLT V., FROKIAER H. (2005). Effect of prior dietary exposure to cows' milk protein on antigen-specific and nonspecific cellular proliferation in mice. *J Dairy Res.*; **72(2)**: 217-25.
- BROADDUS V.C., HEBERT C.A., VITANGCOL R.V. (1992). Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema. *Am. Rev. Respir. Dis.*; **146**: 825–830.
- BRODERSEN B.W., KELLING C.L. (1999). Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus. *Viral Immunol.*; **12(4)**: 323-334.
- BROMANDER A.K., EKMAN L., KOPF M., NEDRUD J.G., LYCKE N.Y. (1996). IL-6-deficient mice exhibit normal mucosal IgA responses to local immunizations and *Helicobacter felis* infection. *J. Immunol.*; **156**: 4290–4297.
- BROWN D.A., KONDO K.L., WONG S.W., DIAMOND D.J. (1992). Characterization of nuclear protein binding to the interferon- γ promoter in quiescent and activated human T cells. *Eur. J. Immunol.*; **22**: 2419–2428.
- BROWN M.A., HURAL J. (1997). Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit. Rev. Immunol.*; **17**: 1–32.

- BROWNING J.L., RIBOLINI A. (1987). Interferon blocks interleukin 1-induced prostaglandin release from human peripheral monocytes. *J. Immunol.*; **138**: 2857–2863.
- BROXMEYER H.E. (2008). Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.*; **15** (1): 49-58.
- BRUGGER W., MOCKLIN W., HEIMFELD S., BERENSON R.J., MERTELMANN R., KANZ L. (1993). Ex vivo Expansion of enriched peripheral blood CD34 + progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1, IL-6, IL-3, interferon- γ and erythropoietin. *Blood*; **81**: 2579–2584.
- BRUNA M.J. (1994). Interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.*; **55**: 280–288.
- BUCHT A., LARSSON P., WEISBROT L., THORNE C., PISA P., SMEDEGARD G., KEYSTONE E.C., GRONBERG A. (1996). Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*; **103**: 357–367.
- BUER J., LANOUE A., FRANZKE A., GARCIA C., VON BOEHMER H., SARUKHAN A. (1998). Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells energized in vivo. *J. Exp. Med.*; **187**: 177–183.
- BURD P.R., ROGERS H.W., GORDON J.R., MARTIN C.A., JAYARAMAN S., WILSON S.D., DVORAK A.M., GALLI S.J., DORF M.E. (1989). Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J. Exp. Med.*; **170**: 245–257.
- BURDIN N., VAN KOOTEN C., GALIBERT L., ABRAMS J.S., WIJDENES J., BANCHEREAU J., ROUSSET F. (1995). Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Immunol.*; **154**: 2533–2544.
- BURGER D., DAYER J.M. (1995). Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors. *Neurology*; **45** (Suppl 6): S39-43.
- BUSTIN S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.*; **25**(2): 169-193.
- BUTLER D.M., MAINI R.N., FELDMANN M., BRENNAN F.M. (1995). Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF α -alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur. Cytokine Netw.*; **6**: 225–230.
- CACCAVO D.; PELLEGRINO N.M.; ALTAMURA M.; RIGON A.; AMATI L.; AMOROSO A.; JIRILLO E. (2002). Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application *Journal of Endotoxin Research*; **(8) 6**: 403-417.
- CALIGIURI M.A., ZMUIDZINAS A., MANLEY T.J., LEVINE H., SMITH K.A., RITZ J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.*; **171**: 1509–1526.
- CALLAN M.F., STEVEN N., KRAUSA P., WILSON J.D., MOSS P.A., GILLESPIE G.M., BELL J.I., RICKINSON A.B., MCMICHAEL A.J. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nature Med.*; **2**: 906–911.
- CALZADA-WACK J.C., FRANKENBERGER M., ZIEGLER-HEITBROCK H.W. (1996). Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. *J. Inflamm.*; **46**: 78–85.
- CAMPBELL I.L., OXBROW L., KOULMANDA M., HARRISON L.C. (1988). IFN- γ induces islet MHC antigens and enhances autoimmune, streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *J. Immunol.*; **140**: 1111–1116.
- CAMPBELL I.L., HARRISON, C. (1990). A new view of the beta cell as an antigen-presenting cell and immunogenic target. *J. Autoimmunity*; **3**: 53–62.
- CAMPBELL I.L., KAY T.W. H., OXBROW L., HARRISON L.C. (1991a). Essential role for interferon- γ and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *J. Clin. Invest.*; **87**: 739–742.

- CAMPBELL I.L., OXBROW L., HARRISON L.C. (1991b). Reduction in insulinitis following administration of IFN- γ and TNF- α in the NOD mouse. *J. Autoimmun.*; **4**: 249–262.
- CANNON J.G., TOMPKINS R.G., GELFAND J.A., MICHIE H.R., STANFORD G.G., VAN DER MEER J.W. M., ENDRES S., LONNEMANN G., CORSETTI J., CHERNOW B., WILMORE D.W., WOLFF S.M., DINARELLO C.A. (1990). Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis.*; **161**: 79–84.
- CANTRELL D.A., SMITH K.A. (1984). The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science*; **224**: 1312–1316.
- CAPSONI F., MINONZIO F., ONGARI A.M., CARBONELLI V., GALLI A., ZANUSSI C. (1995). IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN- γ . *J. Leukoc. Biol.*; **58**: 351–358.
- CARDILLO F., VOLTARELLI J.C., REED S.G., SILVA J.S. (1996). Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immun.*; **64**: 128–134.
- CARRE P.C., MORTENSON R.L., KING T.E. JR. (1991). Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J. Clin. Invest.*; **88**: 1802–1810.
- CARROLL M.C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology*; **5**: 981–986.
- CARVALHO E. (1995) in *Interleukin-10* (ed. J. E. de Vries and R. de Waal Malefyt), IL-10 in human leishmaniasis 79–87 R. G. Landes Co., Austin, TX.
- CASEY L.C., BALK R.A., BONE R.C. (1993). Plasma cytokines and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Intern. Med.*; **119**: 771–778.
- CASSATELLA M.A., BAZZONI F., FLYNN R.M., DUSI S., TRINCHIERI G., ROSSI F. (1990). Molecular basis of interferon- γ and lipopolysaccharide enhancement of phagocytes respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J. Biol. Chem.*; **265**: 20241–20246.
- CASSATELLA M.A., MEDA L., GASPERINI S., CALZETTI F., BONORA S. (1994). Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J. Exp. Med.*; **179**: 1695–1699.
- CASSATELLA M.A., GASPERINI S., CALZETTI F., BERTAGNIN A., LUSTER A.D., MCDONALD P.P. (1997). Regulated production of the interferon- γ -inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur. J. Immunol.*; **27**: 111–115.
- CASTELL J.V., GOMEZ LECHON M.J., DAVID M., HIRANO T., KISHIMOTO T., HEINRICH P.C. (1988). Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.*; **232**: 347–350.
- CATLETT-FALCONE R., LANDOWSKI T.H., OSHIRO M.M., TURKSON J., LEVITZKI A., SAVINO R., CILIBERTO G., MOSCINSKI L., FERNANDEZ-LUNA J.L., NUNEZ G., DALTON W.S., JOVE R. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*; **10**: 105–115.
- CAUX C., MOREAU I., SAELAND S., BANCHEREAU J. (1992). Interferon- γ enhances factor-dependent myeloid proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*; **79**: 2628–2635.
- CAUX C., MASSACRIER C., VANBERVLIET B., BARTHELEMY C., LIU Y.J., BANCHEREAU J. (1994). Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int. Immunol.*; **6**: 1177–1185.
- CAVAILLON J.M., ADIB-CONQUY M., FITTING C., ADRIE C., PAYEN D. (2003). Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis.*; **35(9)**: 535–44.

- CENCI E., ROMANI L., MENCACCI A., SPACCAPELO R., SCHIAFFELLA E., PUC CETTI P., BISTONI F. (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur. J. Immunol.*; **23**: 1034–1038.
- CERON J.J., ECKERSALL P.D., MARTINEZ-SUBIELA S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.*; **34**: 85-99.
- CHABOT S., WILLIAMS G., HAMILTON M., SUTHERLAND G., YONG V.W. (1999). Mechanisms of IL-10 production in human microglia-T cell interaction. *J. Immunol.*; **162**: 6819–6828.
- CHAI Z., GATTI S., TONIATTI C., POLI V., BARFAI T. (1996). Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.*; **183**: 311–316.
- CHAOUAT G. (2007). The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol.*; **29** (2): 95-113.
- CHARLES P., ELLIOTT M.J., DAVIS D., POTTER A., KALDEN J.R., ANTONI C., BREEDVELD F.C., SMOLEN J.S., EBERL G., DEWOODY K., FELDMANN M., MAINI R.N. (1999). Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF α -alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*; **163**: 1521–1528.
- CHARLESTON B., BRACKENBURY L.S., CARR B.V., FRAY M.D., HOPE J.C., HOWARD C.J., MORRISON W.I. (2002). Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhea virus in vivo. *J. Virol.*; **76**(2): 923-927.
- CHASE C.C., ELMOWALID G., YOUSIF A.A. (2004). The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*; **20**(1): 95-114.
- CHAVES M.M., SILVESTRINI A.A., SILVA-TEIXEIRA D.N., NOGUEIRA-MACHADO J.A. (1996). Effect in vitro of gamma interferon and interleukin-10 on generation of oxidizing species by human granulocytes. *Inflamm Res.*; **45**: 313–315.
- CHEN W.-F., ZLOTNIK A. (1991). IL-10: A novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol.*; **147**: 528–534.
- CHITTENDEN T., HARRINGTON E.A., O'CONNOR R., FLEMINGTON C., LUTZ R.J., EVAN G.I., GUILD B.C.: (1995) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*; **374**: 733-736.
- CHOI J, ENIS DR., KOH KP., SHIAO SL., POBER JS.(2004). T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annual Review of Immunology*; **22**: 683-709.
- CHOMARAT P., RISSOAN M.-C., BANCHEREAU J., MIOSSEC P. (1993). Interferon γ inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J. Exp. Med.*; **177**: 523–527.
- CHOMARAT P., VANNIER E., DECHANET J., RISSOAN M.C., BANCHEREAU J., DINARELLO C.A., MIOSSEC P. (1995). Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 beta in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J. Immunol.*; **154**: 1432–1439.
- CHRIST-CRAIN M., MULLER B. (2007). Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J.*; **30**: 556-573.
- CHRIVIA J.C., WEDRYCHOWICZ T., YOUNG H.A., HARDY K.J. (1990). A model of human cytokine regulation based on transfection of interferon gene fragments directly into isolated peripheral blood T lymphocytes. *J. Exp. Med.*; **172**: 661–664.
- CHROUSOS G.P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.*; **332**: 1351–1362.
- CIPPITELLI M., SICA A., VIGGIANO V. *et al.* (1995). Negative transcriptional regulation of the interferon- γ promoter by glucocorticoid and dominant negative mutants of c-Jun. *J. Biol. Chem.*; **270**: 1248–1256.

- CLARK I.A. (2007). How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor.*; **18**: 335-343.
- CLARK R.B. (2002). The role of PPARs in inflammation and immunity. *J. Leukoc. Biol.*; **71**: 388–400.
- CLARK-LEWIS I., DEWALD B., GEISER T. (1993). Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **90**: 3574–3577.
- CLARKE C.J., HALES A., HUNT A., FOXWELL B.M. (1998). IL-10-mediated suppression of TNF α -alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *Eur. J. Immunol.*; **28**: 1719–1726.
- CLERICI M., HAKIM F.T., VENZON D.J., BLATT S., HENDRIX C.W., WYNN T.A., SHEARER G.M. (1993). Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J. Clin. Invest.*; **91**: 759–765.
- CLINCHY B., BJORCK P., PAULIE S., MOLLER G. (1994). Interleukin-10 inhibits motility in murine and human B lymphocytes. *Immunology*; **82**: 376–382.
- CLORE G.M., APPELA E., YAMADA M. (1990). Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry*; **29**: 1689–1696.
- COESHOTT C., OHNEMUS C., PILYAVSKAYA A., ROSS S., WIECZOREK M., KROONA H., LEIMER A.H., CHERONIS J. (1999). Converting enzyme-independent release of TNF α and IL-1 β from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase-3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **96**: 6261–6266.
- COHEN N.D. (1994). Causes of and farm management factors associated with disease and death in foals. *J Am Vet Med Assoc.*; **204**(10): 1644-51.
- COHEN S.B., CRAWLEY J.B., KAHAN M.C., FELDMANN M., FOXWELL B.M. (1997). Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology*; **92**: 1–5.
- COLLEN T., MORRISON W.I. (2000). CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res.*; **67**: 67-80.
- COMINELLI F., NAST C.C., LLERENA R., DINARELLO C.A., ZIPSER R.D. (1990). Interleukin-1 suppresses inflammation in rabbit colitis: mediation by endogenous prostaglandins. *J. Clin. Invest.*; **85**: 582–586.
- CONDOS R., ROM W.N., SCHLUGER N.W. (1997). Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet*; **349**: 1513–1515.
- CORDEAU M.E., JOUBERT P., DEWACHI O., HAMID Q., LAVOIE J.P. (2004). IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet. Immun. Immunopath.*; **97**: 87-96.
- COUSENS L.P., ORANGE J.S., BIRON C.A. (1995). Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Immunol.*; **155**: 5690–5699.
- COX G. (1996). IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am. J. Physiol.*; **271**: L566–L571.
- CRAWLEY E., KAY R., SILLIBOURNE J., PATEL P., HUTCHINSON I., WOO P. (1999). Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*; **42**: 1101–1108.
- CRESSMAN D.E., GREENBAUM L.E., DEANGELIS R.A., CILIBERTO G., FURTH E.E., POLI V., TAUB R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*; **274**: 1379–1383.
- CRISI G.M., SANTAMBROGIO L., HOCHWALD G.M., SMITH S.R., CARLINO J.A., THORBECKE G.J. (1995). Staphylococcal enterotoxin B and tumor-necrosis factor-alpha-indotta relapses of experimental allergic

encephalomyelitis: protection by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Eur. J. Immunol.*; **25**: 3035–3040.

CROSS M.L., GILL H.S. (2000). Immunomodulatory properties of milk. *Br J Nutr.*; **84 Suppl 1**: 81-9.

CROWE P.D., WALTER B.N., MOHLER K.M., OTTEN-EVANS C., BLACK R.A., WARE C.F. A. (1995). Metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF α receptor and TNF α processing in T lymphocytes. *J. Exp. Med.*; **181**: 1205–1210.

CUNARD R., RICOTE M., DICAMPLI D., ARCHER D. C., KAHN D. A., GLASS C. K., KELLY C. J. (2002). Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J. Immunol.*; **168**: 2795–2802.

CUSH J.J., SPLAWSKI J.B., THOMAS R., MCFARLIN J.E., SCHULZE-KOOPS H., DAVIS L.S., FUJITA K., LIPSKY P.E. (1995). Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*; **38**: 96–104.

CUSUMANO V., GENOVESE F., MANCUSO G., CARBONE M., FERA M.T., TETI G. (1996). Interleukin-10 protects neonatal mice from lethal group B streptococcal infection. *Infect. Immun.*; **64**: 2850–2852.

CUZZOCREA S., MAZZON E., BEVILAQUA C., COSTANTINO G., BRITTI D., MAZZULLO G., DE SARRO A., CAPUTI A. P. (2000a) Cloricromene, a coumarine derivative, protects against collagen-induced arthritis in Lewis rats. *Br. J. Pharmacol.*; **131**: 1399–1407.

CUZZOCREA S., SANTAGATI S., SAUTEBIN L., MAZZON E., CALABRO G., SERRAINO I., CAPUTI A.P., MAGGI A.: (2000b). 17 β -Estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinology*; **141**: 1455-1463.

CUZZOCREA S., DI PAOLA R., MAZZON E., GENOVESE T., MUIA C., CENTORRINO T., CAPUTI A. P. (2004). Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors α (PPAR- α) in the development of inflammatory bowel disease in mice. *Lab. Invest.*; **84**: 1643–1654.

D'ANDREA A., ASTE A.M., VALIANTE N.M., MA X., KUBIN M., TRINCHIERI G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.*; **178**: 1041–1048.

D'ORAZIO J.A., BURKE G.W., STEIN-STREILEIN J. (1995). Staphylococcal enterotoxin B activates purified NK cells to secrete IFN- γ but requires T lymphocytes to augment NK cytotoxicity. *J. Immunol.*; **154**: 1014–1023.

DALRYMPLE S.A., LUCIAN L.A., SLATTERY R., MCNEIL T., AUD D.M., FUCHINO S., LEE F., MURRAY R. (1995). Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect. Immun.*; **63**: 2262–2268.

DALRYMPLE S.A., SLATTERY R., AUD D.M., KRISHNA M., LUCIAN L.A., MURRAY R. (1996). Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.*; **64**: 3231–3235.

DARJI A., SILEGHEM M., HEREMANS H., BRYNS L., BILLIAU A., DE BAETSELIER P. (1993). Inhibition of T-cell responsiveness during experimental infections with *Trypanosoma brucei*: active participation of endogenous interferon. *Infect. Immun.*; **61**: 3098–3102.

DARNAY B.G., AGGARWAL B.B. (1997). Early events in TNF α signaling: a story of associations and dissociations. *J. Leukocyte Biol.*; **61**: 559–566.

DAVIDSON N.J., LEACH M.W., FORT M.M., THOMPSON-SNIPES L., KUHN R., MULLER W., BERG D.J., RENNICK D.M. (1996). T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J. Exp. Med.*; **184**: 241–251.

DAVIES C., MCCONNELL M., SLOBBE L., HAGGARTY N., BUCHAN G. (2005). Murine Antigen-Presenting cells are multifunctional in vitro biosensor for detecting the immunoactive potential of bovine milk products. [*J Nutr.*; **135\(11\)**: 2651-6.](#)

- DE WAAL MALEFYT R., ABRAMS J., BENNETT B., FIGDOR C., DE VRIES J. (1991a). IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*; **174**: 1209–1220.
- DE WAAL MALEFYT R., HAANEN J., SPITS H., RONCAROLO M.-G., TE VELDE A., FIGDOR C., JOHNSON K., KASTELEIN R., YSSEL H., DE VRIES J.E. (1991b). IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II MHC expression. *J. Exp. Med.*; **174**: 915–924.
- DE WAAL MALEFYT R., FIGDOR C.G., HUIJBENS R., MOHAN P.S., BENNETT B., CULPEPPER J., DANG W., ZURAWSKI G., DE VRIES J. (1993a). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10. *J. Immunol.*; **151**: 6370–6381.
- DE WAAL MALEFYT R., YSSEL H., DE VRIES J.E. (1993b). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.*; **150**: 4754–4765.
- DE WAAL MALEFYT R., DE VRIES J.E. (1996) in *Human Cytokines: A Handbook For Basic and Clinical Research*, (ed. B. Aggarwal and J. Guterman), Interleukin-10 19–42. Blackwell Science, Cambridge, MA.
- DE WAAL MALEFYT R., MOORE K.M. (1998) in *The Cytokine Handbook*, 3rd edn, (ed. A. Thompson), Interleukin-10 333–364. Academic Press, London.
- DEBRAYE-SACHS M., CARNAUD C., BOITARD C. *et al.* (1991). Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN γ . *J. Autoimmun.*; **4**: 237–248.
- DEBRUE M., HAMILTON E., JOUBERT P., LAJOIE-KADOCH S., LAVOIE J.P. (2005). Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immun. Immunopath.* **105**: 25–31.
- DECARO N., DESARIO C., CAMPOLO M., ELIA G., MARTELLA V., RICCI D., LORUSSO E., BUONAVOGLIA C. (2005). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet Diagn Invest.*; **17**: 133–138.
- DEFRANCE T., VANBERVLIET B., BRIERE F., DURAND I., ROUSSET F., BANCHEREAU J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.*; **175**: 671–682.
- DELERIVE P., DE BOSSCHER K., BESNARD S., VANDEN BERGHE W., PETERS J. M., GONZALEZ F. J., FRUCHART J. C., TEDGUI A., HAEGEMAN G., STAEELS B. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. *J. Biol. Chem.*; **274**: 32048– 32054.
- DELEURAN B., IVERSEN L., KRISTENSEN M., FIELD M., KRAGBALLE K., THESTRUP-PEDERSEN K., STENGAARD-PEDERSEN K. (1994). Interleukin-8 secretion and 15-lipoxygenase activity in rheumatoid arthritis: in vitro anti-inflammatory effects by interleukin-4 and interleukin-10, but not by interleukin-1 receptor antagonist protein. *Br. J. Rheumatol.*; **33**: 520–525.
- DELGADO M., MUNOZ-ELIAS E.J., GOMARIZ R.P., GANEA D. (1999). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J. Immunol.*; **162**: 1707–1716.
- DERKX B., MARCHANT A., GOLDMAN M., BIJLMER R., VAN DEVENTER S. (1995). High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. *J. Infect. Dis.*; **171**: 229–232.
- DEVCHAND P. R., KELLER H., PETERS J. M., VASQUEZ, M, GONZALES F. J., WAHLI W. (1996) The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*; **384**: 39–43.
- DICKENSHEETS H.L., FREEMAN S.L., SMITH M.F., DONNELLY R.P. (1997). Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood*; **90**: 4162–4171.

- DIEHL A.M., YIN M., FLECKENSTEIN J., YANG S.Q., LIN H.Z., BRENNER D.A., WESTWICK J., BAGBY G., NELSON S. (1994). Tumor necrosis factor- α induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol.*; **267**: 552–561.
- DINARELLO C.A. (1997). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.*; **112**: 321–329.
- DINARELLO C.A. (1999). Cytokines as endogenous pyrogens. *J. Infect. Dis.* **179**, (Suppl 2), S294–304.
- DINARELLO C.A. (2003). Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine*; **21** Suppl 2: S24–34.
- DINARELLO C.A. (2005). Interleukin-1 beta. *Crit Care Med.*; **33**: 460–462.
- DINARELLO C.A., CANNON J.G., WOLFF S.M., BERNHEIM H.A., BEUTLER B., CERAMI A., FIGARI I.S., PALLADINO JR., O’CONNOR J.V. (1986b). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med.*; **163**: 1433–1450.
- DINARELLO C.A., CANNON J.G. (1993). Cytokine measurements in septic shock. *Ann. Intern. Med.*; **119**: 853–854.
- DINARELLO C.A., NOVICK D., PUREN A. J. *et al.* (1998). Overview of interleukin-18: more than an interferon- γ inducing factor. *J. Leukoc. Biol.*; **63**: 658–664.
- DING L., SHEVACH E.M. (1992). IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.*; **148**: 3133–3139.
- DING L., LINSLEY P.S., HUANG L.Y., GERMAIN R.N., SHEVACH E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.*; **151**: 1224–1234.
- DINGER M. M., ORWIN P.M., SCHLIEVERT P.M., (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*; **13**: 16–34.
- DOBBER R., TIELEMANS M., NAGELKERKEN L. (1995). The in vivo effects of neutralizing antibodies against IFN- γ , IL-4, or IL-10 on the humoral immune response in young and aged mice. *Cell. Immunol.*; **160**: 185–192.
- DOSREIS G. A., BORGES V. M., ZIN W. A. (2004) The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. *J. Cell. Mol. Med.*; **8**: 285–293.
- DRAPIER J.-C., WIETZERBIN J. (1991). IFN- γ reduces specific binding of tumor necrosis factor on murine macrophages. *J. Immunol.*; **146**: 1198–1203.
- DREVLOW B.E., LOVIS R., HAAG M.A., SINACORE J.M., JACOBS C., BLOSCHKE C., LANDAY A., MORELAND L.W., POPE R.M. (1996). Recombinant human interleukin-1 receptor type I in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*; **39**: 257–265.
- DUNN C.J., HARDEE M.M., STAITE N.D. (1989). Acute and chronic inflammatory responses to local administration of recombinant IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-2 and IFN- γ in mice. *Agents Actions*; **27**: 290–293.
- DUNN, P., NORTH, R.J. (1991). Early interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.*; **59**: 2892–2900.
- DUREZ P., ABRAMOWICZ D., GERARD C., VAN MECHELEN M., AMRAOUI Z., DUBOIS C., LEO O., VELU T., GOLDMAN M. (1993). In vivo induction of interleukin-10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin A. *J. Exp. Med.*; **177**: 551–555.
- DUSTIN M.L., SINGER K.H., TUCK D.T., SPRINGER T.A. (1988). Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon γ and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J. Exp. Med.*; **167**: 1323–1340.

- DUSTIN M.L., ROTHLEIN R., BHAN A.K., DINARELLO C.A., SPRINGER T.A. (1993). Tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). Induction by IL-1 and interferon- γ . *J. Immunol.*; **137**: 245–254.
- DYROY E., YNDESTAD A., HALVORSEN B., DAMAS J. K., AUKRUST P., BERGE R. K. (2005). Antiinflammatory effects of tetradecylthioacetic acid involve both peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent and -independent pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **25**: 1364–1369.
- ECK M.J., SPRANG S.R. (1989). The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.*; **264**: 17595–17605.
- EHLERS M., GROTZINGER J., DE HON F., MULLBERG J., BRAKENHOFF J., LIU J., WOLLMER A., ROSE-JOHN S. (1994). Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. *J. Immunol.*; **153**: 1744–1753.
- EISSNER G., LINDNER H., BEHRENDTS U., KOLCH W., HIEKE A., KLAUKEI., BORNKAMM G.W., HOLLER E. (1996). Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: protective role of IL-10. *Transplantation*; **62**: 819–827.
- ELENKOV I.J., WEBSTER E., PAPANICOLAOU D.A., FLEISHER T.A., CHROUSOS G.P., WILDER R.L. (1998). Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J. Immunol.*; **161**: 2586–2593.
- ELLIOTT M.J., MAINI R.N., FELDMANN M., LONG-FOX A., CHARLES P., KATSIKIS P., BRENNAN F.M., WALKER J., BIIL H., GHAYEB J., WOODY J. (1993). Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to TNF α . *Arthritis Rheum.*; **36**: 1681–1690.
- ELLIOTT M.J., MAINI R.N. (1995). Anti-cytokine therapy in rheumatoid arthritis. *Baillière's Clin. Rheumatol.*; **9**: 633–652.
- EMERY B.E., WHITE M.V., IGARASHI Y., MULLOL J., BERKEBILE C., PEDEN D., LOTZE M.T., KALINER M.A. (1992). The effect of IL-4 on human nasal mucosal responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*; **90**: 772–781.
- EMILIE D., PEUCHMAUR M., MAILLOT M.C., CREVON M.C., BROUSSE N., DELFRAISSY J.F., DORMONT J., GALANAUD P. (1990). Production of interleukins in human immunodeficiency virus-1-replicating lymph nodes. *J. Clin. Invest.*; **86**: 148–159.
- ENDO H., MAIESE K., WAGNER J. (1994). Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res*; **651**: 92–100.
- ENK A.H., ANGELONI V.L., UDEY M.C., KATZ S.I. (1993). Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J. Immunol.*; **151**: 2390–2398.
- ENK A.H., SALOGA J., BECKER D., MOHAMADZADEH M., KNOP J. (1994). Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J. Exp. Med.*; **179**: 1397–1402.
- ERSHLER W.B., HARMAN S.M., KELLER E.T. (1997). Immunologic aspects of osteoporosis. *Dev. Com. Immunol.*; **21**: 487–449.
- ESKDALE J., WORDSWORTH P., BOWMAN S., FIELD M., GALLAGHER G. (1997b). Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*; **49**: 635–639.
- ESPEVIK, T., WAAGE, A., FAXVAAG, A., SHALABY, M.R. (1990). Regulation of interleukin-2 and interleukin-6 production from T-cells: involvement of interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta. *Cell. Immunol.*; **126**: 47–56.
- EVANS R.J., BRAY J., CHILDS J.D., VIGERS G.P. A., BRANDHUBER B.J., SKALICKY J.J., THOMPSON R.C., EISENBERG S.P. (1994). Mapping receptor binding sites in the IL-1 β receptor antagonist and IL-1 β by

- site-directed mutagenesis: identification of a single site in IL-1 β ra and two sites in IL-1 β . *J. Biol. Chem.*; **270**: 11477–11483.
- FAGGIONI R., FANTUZZI G., FULLER J., DINARELLO C.A., FEINGOLD K.R., GRUNFELD C. (1998). IL-1 β mediates leptin induction during inflammation. *Am. J. Physiol.*; **274**: R204–208.
- FANTUZZI G., GHEZZI P. (1993). Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine therapy of inflammatory diseases. *Mediator Inflamm.*; **2**: 263–270.
- FANTUZZI G., ZHENG H., FAGGIONI R., BENIGNI F., GHEZZI P., SIPE J.D., SHAW A.R., DINARELLO C.A. (1996). Effect of endotoxin in IL-1 β -deficient mice. *J. Immunol.*; **157**: 291–296.
- FANTUZZI G., KU G., HARDING M.W., LIVINGSTON D.L., SIPE J.D., KUIDA K., FLAVELL R.A., DINARELLO C.A. (1997a). Response to local inflammation of IL-1 β converting enzyme-deficient mice. *J. Immunol.*; **158**: 1818–1824.
- FANTUZZI G., SACCO S., GHEZZI P., DINARELLO C.A. (1997b). Physiological and cytokine responses in interleukin-1-deficient mice after zymosan-induced inflammation. *Am. J. Physiol.*; **273**: 400–406.
- FARRAR J.D., ASNAGLI H., MURPHY K.M. (2002). T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest.*; **109**(4): 431–5.
- FATTORI E., DELLA ROCCA C., COSTA P., GIORGIO M., POZZI L., CILIBERTO G. (1994a). Development of progressive kidney damage and myeloma kidney in interleukin-6 transgenic topi . *Blood*; **83**: 2570–2579.
- FEIGE U., KARBOWSKI A., RORDORF-ADAM C., PATAKI A. (1989). Arthritis induced by continuous infusion of hr-interleukin-1 into the rabbit knee-joint. *Int. J. Tissue React.*; **11**: 225–238.
- FELDMANN M., BRENNAN F.M., MAINI R.N. (1995) in *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy*, (ed. B. B. Aggarwal and R. K. Puri), Role of cytokines in autoimmune diseases, pp. 185–194 Blackwell Science, Boston.
- FELDMANN M., ELLIOTT M.J., WOODY J.N., MAINI R.N. (1997). Anti tumour necrosis factor therapy of rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.*; **64**: 283–350.
- FENNIE E.H., LIE Y.S., LOW M.-A.L., GRIBLING P., ANDERSON K.P. (1988). Reduced mortality in murine cytomegalovirus infected mice following prophylactic murine interferon- γ treatment. *Antiviral Res.*; **10**: 27–39.
- FERBER I.A., BROCKE S., TAYLOR-EDWARDS C. *et al.* (1996). Mice with a disrupted IFN- γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.*; **156**: 5–7.
- FERRANTINI M., GIOVARELLI M., MODESTI A. *et al.* (1994). IFN γ -1 gene expression into a metastatic murine adenocarcinoma (TS/A) results in CD8+ T cell-mediated tumor rejection and development of antitumor immunity: Comparative studies with IFN- γ -producing TS/A cells. *J. Immunol.*; **153**: 4604–4615.
- FERTSCH D., SCHOENBERG D.R., GERMAIN R.N., TOU J.Y., VOGEL S.N. (1987). Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN- γ and down-regulation by IFN- γ / and dexamethasone are mediated by changes in steady-state levels of Ia mRNA. *J. Immunol.*; **139**: 244–249.
- FINKELMAN F.D., SHEA-DONOHUE T., GOLDHILL J., SULLIVAN C.A., MORRIS S.C., MADDEN K.B., GAUSE W.C., URBAN JR J.F. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.*; **15**: 505–533.
- FIORENTINO D.F., ZLOTNIK A., MOSMANN T.R., HOWARD M., O'GARRA A. (1991a). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*; **147**: 3815–3822.
- FIORENTINO D.F., ZLOTNIK A., VIEIRA P., MOSMANN T.R., HOWARD M., MOORE K.W., O'GARRA A. (1991b). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by TH1 cells. *J. Immunol.*; **146**: 3444–3451.

- FISHER C., AGOSTI JR.J. M., OPAL S.M., LOWRY S.F., BALK R.A., SADOFF J.C., ABRAHAM E., SCHEIN R.M., BENJAMIN E. (1996). Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med.*; **334**: 1697–1702.
- FISCHER, M., GOLDSCHMITT, J., PESCHE, C., BRANENHOFF, J.P. G., KALLEN, K.-J., WOLLMER, A., GROTZINGER, J., ROSE-JOHN, S. (1997). A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature Biotech.*; **15**: 142–145.
- FLEMING S.B., MCCAUGHAN C.A., ANDREWS A.E., NASH A.D., MERCER A.A. (1997). A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus Orf virus. *J. Virol.*; **71**: 4857–4861.
- FLESCH I.E., HESS J.H., OSWALD I.P., KAUFMANN S.H. (1994). Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alpha and by IL-10. *Int. Immunol.*; **6**: 693–700.
- FLORES V.P., CHIKUNGUWO S.M., HARRIS T.S., STADECKER M.J. (1993). Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.*; **151**: 3192–3198.
- FLORES-VILLANUEVA P.O., REISER H., STADECKER M.J. (1994). Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. *J. Immunol.*; **153**: 5190–5199.
- FLORES-VILLANUEVA P.O., ZHENG X.X., STROM T.B., STADECKER M.J. (1996). Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J. Immunol.*; **156**: 3315–3320.
- FLORQUIN S., AMRAOU, Z., ABRAMOWICZ D., GOLDMAN M. (1994). Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Immunol.*; **153**: 2618–2623.
- FLUCKIGER A.C., GARRONE P., DURAND I., GALIZZI J.P., BANCHEREAU J. (1993). Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J. Exp. Med.*; **178**: 1473–1481.
- FLYNN J.L., CHAN J., TRIEBOLD K.J., DALTON D.K., STEWART T.A., BLOOM, B.R. (1993). An essential role for interferon in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.*; **178**: 2249–2254.
- FOEY A.D., PARRY S.L., WILLIAMS L.M., FELDMANN M., FOXWELL B.M., BRENNAN F.M. (1998). Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF α -alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J. Immunol.*; **160**: 920–928.
- FOLKESSON H.G., MATTHAY H.A., HEBERT C.A. (1995). Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8 dependent mechanism. *J. Clin. Invest.*; **96**: 107–116.
- FOURNEL S., GENESTIER L., ROBINET E., FLACHER M., REVILLARD J.P. (1996). Human T cells require IL-2 but not G1/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.*; **157**: 4309–4315.
- FOXWELL B., BROWNE K., BONDESON J., CLARKE C., DE MARTIN R., BRENNAN F., FELDMANN M. (1998). Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **95**: 8211–8215.
- FRANCHINI M., GILL U., VON FELLEBERG R, BRACHER V.D. (2000). Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with ronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *AJVR.*; **11**: 1369-1374.
- FRAUNBERGER P., WANG Y., HOLLER E., PARHOFER K.G., NAGEL D., WALLI A.K., SEIDEL D. (2006). Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock.*; **26**: 10-12.
- FRAZER K.A., UEDA Y., ZHU Y., GIFFORD V.R., GAROFALO M.R., MOHANDAS N., MARTIN C.H., PALAZZOLO M.J., CHENG J., RUBIN E.M. (1997). Computational and biological analysis of 680 kb of DNA sequence from the human 5q31 cytokine gene cluster region. *Genome Res.*; **7**: 495–512.

- FREEDMAN A.S., FREEMAN G.J., RHYNHART K., NADLER L.M. (1991). Selective induction of B7/BB-1 on interferon- γ stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell. Immunol.*; **137**: 429–437.
- FREI K., LEIST T.P., MEAGER A., GALLO P., LEPPERT D., ZINKERNAGEL R.M., FONTANA A. (1988). Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon gamma in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. Evaluation in a murine model infection and in patients. *J. Exp. Med.*; **168**: 449–453.
- FREI K., NADAL D., PFISTER H.W., FONTANA A. (1993). Listeria meningitis: identification of a cerebrospinal fluid inhibitor of macrophage listericidal function as interleukin 10. *J. Exp. Med.*; **178**: 1255–1261.
- FRESHNEY N.W., RAWLINSON L., GUESDON F., JONES E., COWLEY S., HSUAN J., SAKLATVALA J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein cascade that results in the phosphorylation of hsp27. *Cell*; **78**: 1039–1049.
- FUCHS D., HAUSEN A., REIBNEGGER G., WERNER E., DIERICH M.P., WACHTER H. (1988). Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. *Immunol Today.*; **9**: 150-155.
- FUJIIHASHI K., MCGHEE J.R., LUE C., BEAGLEY K.W., TAGA T., HIRANO T., KISHIMOTO T., MESTECKY J., KIYONO H. (1991). Human appendix B cells naturally express receptors for and respond to interleukin 6 with selective IgA1 and IgA2 synthesis. *J. Clin. Invest.*; **88**: 248–252.
- FUJIIHASHI K., KONO Y., KIYONO H. (1992). Effects of IL6 on B cells in mucosal immune response and inflammation. *Res. Immunol.*; **143**: 744–749.
- FUKATA J., USUI T., NAITOH Y., NAKAI Y., IMURA H. (1989). Effects of recombinant human interleukin-1 alpha, -1 beta, 2 and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumour cell line AtT-20. *J. Endocrinol.*; **122**: 33–39.
- FULTZ M.J., BARBER S.A., DIEFFENBACH C.W., VOGEL S.N. (1995). Induction of IFN- γ in macrophages by lipopolysaccharide. *Int. Immunol.*; **5**: 1383–1392.
- GABAY C., KUSHNER I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.*; **340**: 448-454.
- GAJEWSKI T.F., FITCH F.W. (1988). Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.*; **140**: 4252–4252.
- GALLIMORE A., GLITHERO A., GODKIN A., TISSOT A.C., PLUCKTHUN A., ELLIOTT T., HENGARTNER H., ZINKERNAGEL R. (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.*; **187**: 1383–1393.
- GARDLUND B., SJOLIN J., NILSSON A., ROLL M., WICKERTS C.J., WRETLIND B. (1995). Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlations with disease severity. *J Infect Dis.*; **172**: 296-301.
- GARMAN R.D., JACOBS K.A., CLARK S.C., RAULET D.H. (1987). B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **84**: 7629–7633.
- GARNER R.E., KURUGANTI U., CZARNIECKI C.W., CHIU H.H., DOMER J.E. (1989). In vivo immune responses to *Candida albicans* modified by treatment with recombinant murine interferon. *Infect. Immun.*; **57**: 1800–1808.
- GARRONE P., GALIBERT L., ROUSSET F., BANCHEREAU J. (1994). Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen. *J. Immunol.*; **152**: 82–90.
- GASPARI A.A., JENKINS M.K., KATZ S.I. (1988). Class II MHC-bearing keratinocytes induce antigen-specific unresponsiveness in hapten-specific Th1 clones. *J. Immunol.*; **141**: 2216–2220.

- GATT M., REDDY B.S., MacFIE J. (2007). Review article: bacterial translocation in the critically ill- evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther.*; **25**: 52-57.
- GAULDIE J., RICHARDS C., HARNISH D., LANSDORP P., BAUMANN H. (1987). Interferon b2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **84**: 7251-7255.
- GAUTAM S., TEBO J.M., HAMILTON T.A. (1992). IL-4 suppresses cytokine gene expression induced by IFN- γ and/or IL-2 in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*; **148**: 1725-1730.
- GAZZINELLI R., OSWALD I.P., JAMES S.L., SHER A. (1992a). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J. Immunol.*; **148**: 1792-1796.
- GAZZINELLI R.T., OSWALD I.P., HIENY S., JAMES S.L., SHER A. (1992b). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.*; **22**: 2501-2506.
- GAZZINELLI R.T., WYSOCKA M., HIENY S., SCHARTON-KERSTEN T., CHEEVER A., KUHN R., MULLER W., TRINCHIERI G., SHER A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF α -alpha. *J. Immunol.*; **157**: 798-805.
- GEIGER T., TOWBIN H., COSENTI-VARGAS A., ZINGEL O., ARNOLD J., RORDORF C., GLATT M., VOSBECK K. (1993). Neutralization of interleukin-1b activity in vivo with a monoclonal antibody allevates collagen-induced arthritis in DBA/1 mice and prevents the associated acute phase response. *Clin. Exp. Rheumatol.*; **11**: 515-522.
- GENOVESE T., MAZZON E., CRISAFULLI C., DI PAOLA R., MUIA C., BRAMANTI P., CUZZOCREA S. (2005). Immunomodulatory effects of etanercept in an experimental model of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther*; **316**: 1006-1016.
- GENOVESE T., MAZZON E., MENEGAZZI M., DI PAOLA R., MUIA C., CRISAFULLI C., BRAMANTI P., SUZUKI H., CUZZOCREA S. (2006). Neuroprotection and enhanced recovery with hypericum perforatum extract after experimental spinal cord injury in mice. *Shock*; **25**: 608-617.
- GERSHENWALD J.E., FONG Y.M., FAHEY T.J., CALVANO S.E., CHIZZONITE R., KILIAN P.L., LOWRY S.F., MOLDAWER L.L. (1990). Interleukin 1 receptor blockade attenuates the host inflammatory response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **87**: 4966-4970.
- GERVOIS P., VU-DAC N., KLEEMANN R., KOCKX M., DUBOIS G., LAINE B., KOSYKH V., FRUCHART J. C., KOOISTRA T., STAELS B. (2001) Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer binding protein β . *J. Biol. Chem.*; **276**: 33471-33477.
- GESSANI S., BELARDELLI F. (1998). IFN- γ expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev*; 117-123.
- GHEZZI P., DINARELLO C.A., BIANCHI M., ROSANDICH M.E., REPINE J.E., WHITE C.W. (1991). Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine*; **3**: 189-194.
- GHILDYAL N., MCNEIL H.P., GURISH M.F., AUSTEN K.F., STEVENS R.L. (1992a). Transcriptional regulation of the mucosal mast cell-specific protease gene, MMCP-2, by interleukin 10 and interleukin 3. *J. Biol. Chem.*; **267**: 8473-8477.
- GHILDYAL N., MCNEIL H.P., STECHSCHULTE S., AUSTEN K.F., SILBERSTEIN D., GURISH M.F., SOMERVILLE L.L., STEVENS R.L. (1992b). IL-10 induces transcription of the gene for mouse mast cell protease-1, a serine protease preferentially expressed in mucosal mast cells of *Trichinella spiralis*-infected mice. *J. Immunol.*; **149**: 2123-2129.

- GHILDYAL N., FRIEND D.S., NICODEMUS C.F., AUSTEN K.F., STEVENS R.L. (1993). Reversible expression of mouse mast cell protease 2 mRNA and protein in cultured mast cells exposed to IL-10. *J. Immunol.*; **151**: 3206–3214.
- GHOSH P., TAN T.-H., RICE N.R., SICA A., YOUNG H.A. (1993). The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NF- κ B family: c-Rel, p50, and p65. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **90**: 1696–1700.
- GIBBONS R., MARTINEZ O., MATLI M., HEINZEL F., BERNSTEIN M., WARREN R. (1990). Recombinant IL-4 inhibits IL-6 synthesis by adherent peripheral blood cells in vitro. *Lymphokine Res.*; **9**: 283–293.
- GIGUÈRE S., PRESCOTT J.F. (1999). Quantitation of equine cytokine mRNA expression by transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet. Immun. Immunopath.*; **67**: 1–15.
- GIGUERE S., VIEL L., LEE E., MACKAY R.J., HERNANDEZ J., FRANCHINI M. (2002). Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immun. Immunopath.*; **85**: 147–158.
- GILL H.S., DOULL F., RUTHERFURD K.J., CROSS M.L. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr.*; **84 Suppl 1**: S111–7.
- GILLIS S., CRABTREE G.R., SMITH K.A. (1979a). Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.*; **123**: 1624–1631.
- GILLIS S., CRABTREE G.R., SMITH K.A. (1979b). Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. II. The effect on the in vitro generation of cytolytic T cells. *J. Immunol.*; **123**: 1632–1638.
- GIMBRONE M.A. JR., OBIN M.S., BROCK A.F. (1989). Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*; **246**: 1601–1603.
- GIRASOLE G., JILKA R.L., PASSERI G., BOSWELL S., BODER G., WILLIAMS D.C., MANOLAGAS S.C. (1992). 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J. Clin. Invest.*; **89**: 883–891.
- GIRAUDO E., PRIMO L., AUDERO E., GERBER H.P., KOOLWIJK P., SOKER S., KLAGSBRUN M., FERRARA N., BUSSOLINO F. (1998). Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*; **273**: 22128–22135.
- GOODING L.R. (1992). Virus proteins that counteract host immune responses. *Cell*; **71**: 5–7.
- GOULET J.L., SNOUWAERT J.N., LATOUR A.M. (1994). Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **91**: 12852–12856.
- GRAHAM M.B., DALTON D.K., GILTINAN D., BRACIALE V.L., STEWART T.A., BRACIALE T.J. (1993). Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon γ gene. *J. Exp. Med.*; **178**: 1725–1732.
- GRANOWITZ E.V., PORAT R., MIER J.W., ORENCOLE S.F., CALLAHAN M.V., CANNON J.G., LYNCH E.A., YE K., POUTSIKA D.D., VANNIER E., SHAPIRO L., PRIBBLE J.P., STILES D.M., CATALANO M.A., WOLFF S.M., DINARELLO C.A. (1993). Hematological and immunomodulatory effects of an interleukin-1 receptor antagonist coinfusion during low-dose endotoxemia in healthy humans. *Blood*; **82**: 2985–2990.
- GREEN S.J., NACY C.A., MELTZER M.S. (1991). Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. *J. Leukoc. Biol.*; **50**: 93–103.
- GREENBERGER M.J., STRIETER R.M., KUNKEL S.L., DANFORTH J.M., GOODMAN R.E., STANDIFORD T.J. (1995). Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia. *J. Immunol.*; **155**: 722–729.

- GREENFEDER S.A., NUNES P., KWEE L., LABOW M., CHIZZONITE R.A., JU G. (1995). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin-1 receptor complex. *J. Biol. Chem.*; **270**: 13757–13765.
- GREINER J.W., GUADAGNI F., HAND P.H., PESTKA S., NOGUCHI P., FISHER P.B. (1990). Augmentation of tumor antigen expression by recombinant human interferons: enhanced targeting of monoclonal antibodies to carcinomas. *Cancer Treatment Res.*; **51**: 413–432.
- GRELL M., DOUNI E., WAJANT H., LOHDEN M., CLAUSS M., MAXEINER B., GEORGOPOULOS S., LESSLAUER W., KOLLIAS G., PFIZENMAIER K., SCHEURICH P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*; **83**: 793–802.
- GREWAL IS., FLAVELL RA. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annual Review of Immunology*; **16**: 111-135.
- GROSSMAN R.M., KRUEGER J., YOURISH D., GRANELLI PIPERNO A., MURPHY D.P., MAY L.T., KUPPER T.S., SEHGAL P.B., GOTTLIEB A.B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **86**: 6367–6371.
- GROUX H., BIGLER M., DE VRIES J.E., RONCAROLO M.G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.*; **184**: 19–29.
- GROUX H., BIGLER M., DE VRIES J.E., RONCAROLO M.G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J. Immunol.*; **160**: 3188–3193.
- GROUX H., COTTREZ F., ROULEAU M., MAUZE S., ANTONENKO S., HURST S., MCNEIL T., BIGLER M., RONCAROLO M.G., COFFMAN R.L. (1999). A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J. Immunol.*; **162**: 1723–1729.
- GRUBER M.F., WILLIAMS C.C., GERRARD T.L. (1994). Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *J. Immunol.*; **152**: 1354–1361.
- GRUETTER M.G., VAN OOSTRUM J., PRIESTLE J.P., EDELMANN E., JOSS U., FEIGE U., VOSBECK K., SCHMITZ A. (1994). A mutational analysis of receptor binding sites of interleukin-1: differences in binding of human interleukin-1 muteins to human and mice receptors. *Protein Eng.*; **7**: 663–671.
- GRUNFELD C., ADI S., SOUED M., MOSER A., FIERS W., FEINGOLD K.R. (1990). Search for mediators of the lipogenic effects of tumor necrosis factor: potential role for interleukin 6. *Cancer Res.*; **50**: 4233–4238.
- GRUOL L.D., NELSON E.T. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.*; **15**: 307–339.
- GRUSS H.J., DOWER S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*; **85**: 3378–3404.
- GRUYS E., TOUSSAINT M.J.M., NIEWOLD T.A., KOOPMANS S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ SCI*; **6B**: 1045-1056.
- GUERNE P.A., CARSON D.A., LOTZ M. (1990). IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J. Immunol.*; **144**: 499–505.
- GUSELLA G.L., MUSSO T., BOSCO M.C., ESPINOZA-DELGADO I., MATSUSHIMA K., VARESIO L. (1993). IL-2 up-regulates but IFN- γ suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J. Immunol.*; **151**: 2725–2732.
- GUY-GRAND D., DISANTO J.P., HENCHOZ P., MALASSIS-SÉRIS M., VASSALLI, P. (1998). Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN- γ , TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur. J. Immunol.*; **28**: 730–744.

- GWECHENBERGER M., MENDOZA L.H., YOUKER K.A., FRANGOGIANNIS N.G., SMITH W., MICHAEL L.H., ENTMAN M.I. (1999). Cardiac myocytes produce interleukin-6 in colture and viable Border Zone of reperfused infarctions. *Circulation.*; **99**: 546-551.
- HAAGMANS B.L., VAN DER MEIDE P.H., STALS F. S. *et al.* (1994). Suppression of rat cytomegalovirus replication by antibodies against interferon. *J. Virol.*; **68**: 2305–2312.
- HAGENBAUGH A., SHARMA S., DUBINETT S.M., WEI S. H.-Y., ARANDA R., CHEROUTRE H., FOWELL D., BINDER S., TSAO B., LOCKSLEY R.M., MOORE K.W., KRONENBERG M. (1997). Altered immune responses in IL-10 transgenic mice. *J. Exp. Med.*; **185**: 2101–2110.
- HAGIWARA E., GOURLEY M.F., LEE S., KLINMAN D.K. (1996). Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10:interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum.*; **39**: 379–385.
- HAMID Q., BARKINS J., MENG Q., YANG S., ABRAMA J.S., KAY A.B., MOQBEL R. (1992). Human eosinophili synthesise and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood*; **80**: 1496–1501.
- HAMILTON T.A., BREDON N., OHMORI Y., TANNENBAUM C.S. (1989). IFN- γ and IFN γ - independently stimulate the expression of lipopolysaccharide-inducible genes in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*; **142**: 2325–2331.
- HARADA A., SEKIDO N., KUNO K. (1993). Expression of recombinant rabbit IL-8 in Escherichia coli and establishment of the essential involvement of IL-8 in recruiting neutrophils into lipopolysaccharide-induced inflammatory site of rabbit skin. *Int. Immunol.*; **6**: 681–690.
- HARDING F.A., MCARTHUR J.G., GROSS J.A., RAULET D.H., ALLISON J.P. (1992). CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*; **356**: 607–609.
- HARGREAVES K. M., TROULLOS E. S., DIONNE R. A., SCHMIDT E. A., SCHAFER S. C., JORIS J. L. (1988) Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin. Pharmacol. Ther.*; **44**: 613– 621.
- HARRIS N., BULLER R.M. L., KARUPIAH G. (1995). Interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J. Virol.*; **69**: 910–915.
- HART P.H., HUNT E.K., BONDER C.S., WATSON C.J., FINLAY-JONES J.J. (1996). Regulation of surface and soluble TNF α receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J. Immunol.*; **157**: 3672–3680.
- HAVELL E.A., MOLDAWER L.L., HELFGOTT D., KILIAN P.L., SEHGAL P.B. (1992). Type I IL-1 β receptor blockade exacerbates murine listeriosis. *J. Immunol.*; **148**: 1486–1492.
- HAYGLASS K.T., WANG M., GIENI R.S., ELLISON C., GARTNER J. (1996). In vivo direction of CD4 T cells to Th1 and Th2-like patterns of cytokine synthesis. *Adv Exp Med Biol.*; **409**: 309-16.
- HAZUDA D.J., STRICKLER J., KUEPPERS F., SIMON P.L., YOUNG P.R. (1990). Processing of precursor interleukin-1 beta and inflammatory disease. *J. Biol. Chem.*; **265**: 6318– 6322.
- HAZUDA D.J., STRICKLER J., SIMON,P., YOUNG P.R. (1991). Structure-function mapping of interleukin 1 precursors. Cleavage leads to a conformational change in the mature protein. *J. Biol. Chem.*; **266**: 7081–7086.
- HEDRICK J.A., HELMS A., VICARI A., ZLOTNI A. (1998). Characterization of a novel CC chemochine, HCC-4, whose expression is increased by interleukin-10. *Blood*; **91**: 4242–4247.
- HEGYI E., NAVARRO S., DEBILI N., MOUTHON M.A., KATZ A., BRETON GORIUS J., VAINCHENKER W. (1990). Regulation of human megakaryocytopoiesis: analysis of proliferation, ploidy and maturation in liquid cultures. *Int. J. Cell Cloning*; **8**: 236–244.
- HEIMFELD S., HUDAK S., WEISSMAN I., RENNICK D. (1991). The in vitro response of phenotypically defined mice stem cells and myeloerythroid progenitors to a single or multiple growth factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **88**: 9902–9906.

- HEINZEL F.P., RERKO R.M., LING P., HAKIMI J., SCHOENHAUT D.S. (1994). Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of interferon. *Infect. Immun.*; **62**: 4244–4249.
- HEISE M.T., VIRGIN H.W. (1995). The T-cell-independent role of interferon and tumor necrosis factor in macrophage activation during murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. *J. Virol.*; **69**: 904–909.
- HELFGOTT D.C., MAY L.T., STHOEGER Z., TAMM I., SEHGAL P.B. (1987). Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J. Exp. Med.*; **166**: 1300–1309.
- HELLE M., BOEIJE L., AARDEN L.A. (1989). IL-6 is an intermediate in IL-1-induced thymocyte proliferation. *J. Immunol.*; **142**: 4335–4338.
- HENRY Y., LEPOIVRE M., DRAPIER J.-C., DUCROCQ C., BOUCHER J.-L., GUISSANI A. (1993). EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.*; **7**: 1124–1134.
- HERBERT C.A., VITANGCOL R.V., BAKER I.T. (1991). Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J. Biol. Chem.*; **266**: 18989–18994.
- HEREMANS H., DIJKMANS R., SOBIS H., VANDEKERCKHOVE F., BILLIAU A. (1987). Regulation by interferons of the local inflammatory response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*; **138**: 4175–4179.
- HEREMANS H., VAN DAMME J., DILLEN C., DIJKMANS R., BILLIAU A. (1990). Interferon- γ , a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.*; **171**: 1853–1869.
- HEREMANS H., DILLEN C., BILLIAU A. (1996a). Role of IFN- γ and IL-12 in a model for chronic relapsing EAE in Biozzi mice. *Eur. Cytokine Network*; **7**: 458.
- HEREMANS H., BILLIAU A. (1997). In *Interferon Therapy of Multiple Sclerosis*, (ed. A. T. Reder), The effects of interferons and other cytokines on experimental autoimmune encephalomyelitis., 215–244 Marcel Dekker, New York.
- HERSHMAN M.J., POLK H.C., PIETSCH J.D., KUFTINEC D., SONNENFELD, G. (1988a). Modulation of Klebsiella pneumoniae infection of mice by interferon- γ . *Clin. Exp. Immunol.*; **72**: 406–409.
- HERSHMAN M.J., POLK H.C., PIETSCH J.D., SHIELDS R.E., WELLHAUSEN S.R., SONNENFELD G. (1988b). Modulation of infection by interferon treatment. *Infect. Immun.*; **56**: 2412–2416.
- HERSHMAN M.J., SONNENFELD G., LOGAN W.A., PIETSCH J.D., WELLHAUSEN S.R., POLK H.C. (1988c). Effect of interferon- γ on the course of a burn wound infection. *J. Interferon Res.*; **8**: 367–373.
- HIBI M., NAKAJIMA K., HIRANO T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med.*; **74**(1): 1-12.
- HILL M. R., CLARKE S., RODGERS K., THORNHILL B., PETERS J. M., GONZALEZ F. J., GIMBLE J. M. (1999) Effect of peroxisome proliferator-activated receptor α activators on tumor necrosis factor expression in mice during endotoxemia. *Infect. Immun.*; **67**: 3488–3493.
- HINSHAW L. B., TEKAMP-OLSON P., CHANG A.C., LEE P.A., TAYLOR F.B. JR., MURRAY C.K., PEER G.T., EMERSON T.E. JR., PASSEY R.B., KUO G.C. (1990). Survival of primates in LD100 septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF α alpha). *Circ. Shock*; **30**: 279–292.
- HIRANO T. (1991). Interleukin 6 (IL-6) and its receptor: their role in plasma cell neoplasias. *Int. J. Cell Cloning*; **9**: 166–184.
- HIRANO T. (1992). The biology of interleukin-6. *Chem. Immunol.*; **51**: 153–180.
- HIRANO, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.*; **16**: 249–284.
- HIRANO T., TERANISHI T., TOBA T., SAKAGUCHI N., FUKUKAWA T., TSUYUGUCHI I. (1981). Human helper T cell factor(s) (ThF). I. Partial purification and characterization. *J. Immunol.*; **126**: 517–522.

- HIRANO T., TERANISHI T., LIN B., ONOUE K. (1984a). Human helper T cell factor(s). IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on Staphylococcus aureus Cowan I-stimulated B cells. *J. Immunol.*; **133**: 798–802.
- HIRANO T., TERANISHI T., ONOUE K. (1984b). Human helper T cell factor(s). III. Characterization of B cell differentiation factor I (BCDF I). *J. Immunol.*; **132**: 229–234.
- HIRANO T., TAGA T., YASUKAWA K., NAKAJIMA K., NAKANO N., TAKATSUKI F., SHIMIZU M., MURASHIMA A., TSUNASAWA S., SAKIYAMA F., KISHIMOTO T. (1987). Human B cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **84**: 228–231.
- HIRANO T., MATSUDA T., TURNER M., MIYASAKA N., BUCHAN G., TANG B., SATO K., SHIMIZU M., MAINI R., FELDMANN M., KISHIMOTO T. (1988). Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*; **18**: 1797–1801.
- HIROTA H., KIYAMA H., KISHIMOTO T., TAGA T. (1996). Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J. Exp. Med.*; **183**: 2417–2419.
- HODGKIN P.D., BOND M.W., O’GARRA A., FRANK G., LEE F., COFFMAN R.L., ZLOTNIK A., HOWARD M. (1988). Identification of IL-6 as a T cell-derived factor that enhances the proliferative response of thymocytes to IL-4 and phorbol myristate acetate. *J. Immunol.*; **141**: 151–157.
- HOFFMANN G., TOTZKE G., SEIBEL M., SMOLNY M., WIEDEMANN F.J., SCHOBERSBERGER W. (2001). In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Crit Care Med.*; **29**: 112–116.
- HOHLBAUM A. M., GREGORY M. S., JU S. T., MARSHAK-ROTHSTEIN A. (2001) Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. *J. Immunol.*; **167**: 6217–6224.
- HOLSTI M.A., RAULET D.H. (1989). IL-6 and IL-1 synergize to stimulate IL-2 production and proliferation of peripheral T cells. *J. Immunol.*; **143**: 2514–2519.
- HOPKEN U.E., LU B., GERARD N.P. (1996). The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature*; **383**: 86–89.
- HORII Y., MURAGUCHI A., SUEMATSU S., MATSUDA T., YOSHIZAKI K., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1988). Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J. Immunol.*; **141**: 1529–1535.
- HORII Y., MURAGUCHI A., IWANO M., MATSUDA T., HIRAYAMA T., YAMADA H., FUJII Y., DOHI K., ISHIKAWA H., OHMOTO Y., YOSHIZAKI K., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1989). Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.*; **143**: 3949–3955.
- HOTCHKISS R.S., KARL I.E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.*; **348**: 138–150.
- HOUSSIAU F.A., COULIE P.G., OLIVE D., VAN SNICK J. (1988). Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6. *Eur. J. Immunol.*; **18**: 653–656.
- HOUSSIAU F.A., COULIE P. G., VAN SNICK J. (1989). Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation. *J. Immunol.*; **143**: 2520–2524.
- HOUSSIAU F., VAN SNICK J. (1992). IL6 and the T-cell response. *Res. Immunol.*; **143**: 740–743.
- HOUSSIAU F.A., LEFEBVRE C., VANDEN BERGHE M., LAMBERT M., DEVOGELAER J.P., RENAULD J.C. (1995). Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus*; **4**: 393–395.

- HSU D.-H., MOORE K.W., SPITS H. (1992). Differential effects of interleukin-4 and -10 on interleukin-2-induced interferon- synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int. Immunol.*; **4**: 563–569.
- HUANG S., HENDRIKS W., ALTHAGE A. *et al.* (1993). Immune response in mice that lack the interferon- γ receptor. *Science*; **259**: 1742–1745.
- HUBER A.R., KUNKEL S.L., TODD R.F. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*; **254**: 99–102.
- HULTÉN C., DEMMERS S. (2002). Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Vet J.*; **34(7)**: 693-8.
- HUNTER C.A., SUBAUSTE C.S., VAN CLEAVE V.H., REMINGTON J.S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.*; **62**: 2818–2824.
- IKEBUCHI K., WONG G.G., CLARK S.C., IHLE J.N., HIRAI Y., OGAWA M. (1987). Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **84**: 9035–9039.
- INOUE S., KAWANISHI S. (1995) Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett.*; **371**: 86–88.
- ISHIBASHI T., KIMURA H., SHIKAMA Y., UCHIDA T., KARIYONE S., HIRANO T., KISHIMOTO T., TAKATSUKI F., AKIYAMA Y. (1989a). Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice . *Blood*; **74**: 1241–1244.
- ISHIBASHI T., KIMURA H., UCHIDA T., KARIYONE S., FRIESE P., BURSTEIN S.A. (1989b). Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **86**: 5953–5957.
- ISHIDA H., HASTINGS R., THOMPSON S.L., HOWARD M. (1993). Modified immunological status of anti-IL-10 treated mice. *Cell Immunol.*; **148**: 371–384.
- ISHIDA H., MUCHAMUEL T., SAKAGUCHI S., ANDRADE S., MENON S., HOWARD M. (1994). Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J. Exp. Med.*; **179**: 305–310.
- ISHIDA Y., NISHI M., TAGUCHI O., INABA K., MINATO N., KAWAICHI M., HONJO T. (1989). Effects of the deregulated expression of interleuchina 2 in transgenic mice. *Int. Immunol.*; **1**: 113–120.
- ISHIMI Y., MIYAURA C., JIN C.H., AKATSU T., ABE E., NAKAMURA Y., YAMAGUCHI A., YOSHIKI S., MATSUDA T., HIRANO T., KISHIMOTO T., SUDA T. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.*; **145**: 3297–3303.
- ISOGAI E., ISOGAI H., ONUMA M, MIZUKOSHI N., HAYASHI M., NAMIOKA S. (1989). Escherichia coli associated endotoxemia in dogs with parvovirus infection. *Nippon Juigaku Zasshi.*; **51**: 597-606.
- ISSAZADEH S., LJUNGDAHL A., HOJEBERG B., MUSTAFA M., OLSSON T. (1995). Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. *J. Neuroimmunol.*; **61**: 205–212.
- ISSAZADEH S., LORENTZEN J.C., MUSTAFA M.I., HOJEBERG B., MUSSENER A., OLSSON T. (1996). Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J. Neuroimmunol.*; **69**: 103–115.
- ITOH K., HIROHATA S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J. Immunol.*; **154**: 4341–4350.

- IWASAKI A., KELSALL B.L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.*; **190**: 229–239.
- JACKSON T. A., RICHER J. K., BAIN D. L., TAKIMOTO G. S., TUNG L., HORWITZ K. B. (1997) The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol. Endocrinol.*; **11**: 693–705.
- JACKSON S. M., PARHAMI F., XI X. P., BERLINER J. A., HSUEH W. A., LAW R. E., DEMER L. L. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **19**: 2094–2104.
- JACOBSON E.L., PILARO F., SMITH K.A. (1996). Rational interleukin 2 therapy for HIV positive individuals: daily low doses enhance immune function without toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **93**: 10405–10410.
- JANSEN P.M., VAN DER POWW KRAAN T.C., DE JONG I.W., VAN MIERLO G., WIJDENES J., CHANG A.A., AARDEN L.A., TAYLOR F.B. JR., HACK C.E. (1996). Release of interleukin-12 in experimental Escherichia coli septic shock in baboons: relation to plasma levels of interleukin-10 and interferon-gamma. *Blood*; **87**: 5144–5151.
- JARDETZKY T.S., BROWN J.H., GORGA J.C. (1994). Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*; **368**: 711–718.
- JARROUS N., KAEMPFER R. (1994). Induction of human interleukin-1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. *J. Biol. Chem.*; **269**: 23141–23149.
- JENKINS J.K., MALYAK M., AREND W.P. (1994). The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res.*; **13**: 47–54.
- JILKA R.L., HANGOC G., GIRASOLE G., PASSERI G., WILLIAMS D.C., ABRAMS J.S., BOYCE B., BROXMEYER H., MANOLAGAS S.C. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*; **257**: 88–91.
- JOHNSON W.J., BRETON J., NEWMAN-TARR T., CONNOR J.R., MEUNIER P.C., DALTON B.J. (1990). Interleukin-1 release by rat synovial cells is dependent on sequential treatment with interferon and lipopolysaccharide. *Arthritis Rheum.*; **33**: 261–267.
- JOHNSON L.L., VANDERVEGT F.P., HAVELL E.A. (1993). Interferon-dependent temporary resistance to acute Toxoplasma gondii infection independent of CD4+ or CD8+ lymphocytes. *Infect. Immun.*; **61**: 5174–5180.
- JOHNSON B.W., BOISE L.H. (1999). Bcl-2 and caspase inhibition cooperate to inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced cell death in a Bcl-2 cleavage-independent fashion. *J. Biol. Chem.*; **274**: 18552–18558.
- JONES E.Y., STUART D.I., WALKER N.P. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature*; **338**: 225–228.
- JOOSTEN L.A., LUBBERTS E., DUREZ P., HELSEN M.M., JACOBS M.J., GOLDMAN M., VAN DEN BERG W.B. (1997). Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum.*; **40**: 249–260.
- JOUBERT P., SILVERSIDES, D W., LAVOIE J.P. (2001). Equine neutrophils express mRNA for tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon- γ . *Equine vet. J.*; **33**: 730-733.
- JOURDAN M., BATAILLE R., SEGUIN J., ZHANG X.G., CHAPTAL P.A., KLEIN B. (1990). Constitutive production of interleukin-6 and immunologic features in cardiac myxomas. *Arthritis Rheum.*; **33**: 398–402.
- JUNGI T.W., BRCIC M., EPERON S., ALBRECHT S. (1994). Transforming growth factor-beta and interleukin-10, but not interleukin-4, down-regulate procoagulant activity and tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Thromb. Res.*; **76**: 463–474.
- KAGAYA K., WATANABE K., FUKASAWA Y. (1989). Capacity of recombinant interferon to activate macrophages for Salmonella-killing activity. *Infect. Immun.*; **57**: 609–615.

- KAISER P., WAIN H.L., ROTHWELL L. (1998). Structure of the chicken interferon- γ gene, and comparison to mammalian homologues. *Gene*; **207**: 25–32.
- KAMEDA T., MATSUZAKI N., SAWAI K., OKADA T., SAJI F., MATSUDA T., HIRANO T., KISHIMOTO T., TANIZAWA O. (1990). Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*; **11**: 205–213.
- KAMIJO R., SHAPIRO D., LE J., HUANG S., AGUET M., VILCEK J. (1993b). Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **90**: 6626–6630.
- KANG C.J., SHERIDAN C., KOSHLAND M.E. (1998). A stage-specific enhancer of immunoglobulin J. chain gene is induced by interleukin-2 in a presecretor B cell stage. *Immunity*; **8**: 285–295.
- KAPLAN D.H., SHANKARAN V., DIGHE A. S. *et al.* (1998). Demonstration of an interferon -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **95**: 7556–7561.
- KARUPIAH G., FREDRICKSON T.N., HOLMES K.L., KHAIRALLAH L.H., BULLER R.M. L. (1993a). Importance of interferons in recovery from mousepox. *J. Virol.*; **67**: 4214–4226.
- KARUPIAH G., XIE Q., BULLER R.M. L., NATHAN C., DUARTE C., MACMICKING J.D. (1993b). Inhibition of viral replication by interferon- γ -induced nitric oxide synthase. *Science*; **261**: 1445–1448.
- KASAMA T., STRIETER R.M., LUKACS N.W., LINCOLN P.M., BURDICK M.D., KUNKEL S.L. (1995). Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.*; **95**: 2868–2876.
- KASID A., DIRECTOR E.P., ROSENBERG S.A. (1989). Induction of endogenous cytokine-mRNA in circulating peripheral blood mononuclear cells by IL-2 administration to cancer patients. *J. Immunol.*; **143**: 736–739.
- KATSIKIS P.D., CHU C.Q., BRENNAN F.M., MAINI R.N., FELDMANN M. (1994). Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.*; **179**: 1517–1527.
- KATSUKI M., KIMURA M., OHTA M., OTANI H., TANAKA O., YAMAMOTO M., HOMURA T., HABU S. (1989). Lymphocyte infiltration into the cerebellum in transgenic mice carrying human IL2 gene. *Int. Immunol.*; **1**: 214–218.
- KAWANO M., HIRANO T., MATSUDA T., TAGA T., HORII Y., IWATO K., ASAOKU H., TANG B., TANABE O., TANAKA H., KURAMOTO A., KISHIMOTO T. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*; **332**: 83–85.
- KAWANO Y., NOMA T., YATA J. (1994). Regulation of human IgG subclass production by cytokines: IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J. Immunol.*; **153**: 4948–4958 .
- KELLY, G.S. (2003). Bovine Colostrums: A review of clinical uses. *Alternative Medicine Review*; **(8)4**: 378-394.
- KENNEDY M.K., TORRANCE D.S., PICHA K.S., MOHLER K.M. (1992). Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J. Immunol.*; **149**: 2496–2505.
- KHABAR K S., AL-ZOGHAIBI F., AL-AHDAL M.N., MURAYAMA T., DHALLA M., MUKAIDA N., TAHA M., AL-SEDAIRY S.T., SIDDIQUI Y., KESSIE G., MATSUSHIMA K. (1997). The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. *J Exp Med.*; **186(7)**: 1077-85.
- KIKUTANI H., TAGA T., AKIRA S., KISHI H., MIKI Y., SAIKI O., YAMAMURA Y., KISHIMOTO T. (1985). Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J. Immunol.*; **134**: 990–995.
- KIM H.S., ARMSTRONG D., HAMILTON T.A., TEBO J.M. (1998). IL-10 suppresses LPS-induced KC mRNA expression via a translation-dependent decrease in mRNA stability. *J. Leukoc. Biol.*; **64**: 33–39.

- KING C.L., GALLIN J.I., MALECH H.L., ABRAMSON S.L. (1989). Regulation of immunoglobulin production in hyperimmunoglobulin E recurrent-infection syndrome by interferon . *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **86**: 10085–10089.
- KING C.L., LOW C.C., NUTMAN T.B. (1993). IgE production in human helminth infection: reciprocal interrelationship between IL-4 and IFN- γ . *J. Immunol.*; **150**: 1873–1880.
- KING C.L., MEDHAT A., MALHOTRA I., NAFEH M., HELMY A., KHAUDARY J., IBRAHIM S., EL-SHERBINY M., ZAKY S., STUPI R.J., BRUSTOSKI K., SHEHATA M., SHATA M.T. (1996). Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *J. Immunol.*; **156**: 4715–4721.
- KING L.G., WOHL J.S., MANNING A.M., HACKNER S.G., RAFFE M.R., MAISLIN G. (2001). Evaluation of the survival prediction index as a model of risk stratification for clinical research in dogs admitted to intensive care units at four locations. *Am J Vet Res.*; **62**: 948-954.
- KISHIMOTO T., HIRANO T. (1988). Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu. Rev. Immunol.*; **6**: 485–512.
- KISHIMOTO T., AKIRA S., TAGA T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*; **258** (5082): 593-7.
- KISHORE R., TEBO J.M., KOLOSO M., HAMILTON T.A. (1999). Clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J. Immunol.*; **162**: 2457–2461.
- KITAMURA T., TAKAKU F. (1989). A preclinical and Phase I clinical trial of IL-1 β . *Exp. Med.*; **7**: 170–177.
- KITANI A., STROBER W. (1993). Regulation of C subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J. Immunol.*; **151**: 3478–3488.
- KLAUSNER J.D., FREEDMAN V.H., KAPLAN G. (1996). Thalidomide as an anti-TNF α inhibitor: implications for clinical use (review). *Clin. Immunol. Immunopathol.*; **81**: 219–223.
- KLEEMANN R., GERVOIS P. P., VERSCHUREN L., STAELS B., PRINCEN H. M., KOOISTRA T. (2003). Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NF κ B-C/EBP complex formation. *Blood*; **101**: 545–551.
- KLEIBER C., MCGORUM B.C., HOROHOV D.W., PIRIE R.S., ZURBRIGGEN A., STRAUB R. (2005). Cytokine profiles of eripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immun. Immunopath.*; **104**: 91-97.
- KLEIN B., ZHANG X.G., JOURDAN M., CONTENT J., HOUSSIAU F., AARDEN L., PIECHACZYK M., BATAILLE R. (1989). Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*; **73**: 517–526.
- KLEIN B., WIJDENES J., ZHANG X.G., JOURDAN M., BOIRON J.M., BROCHIER J., LIAUTARD J., MERLIN M., CLEMENT C., MOREL FOURNIER B. (1991). Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood*; **78**: 1198–1204.
- KO Y.C., MUKAIDA N., ISHIYAMA S. (1993). Elevated interleukin-8 levels in the urine of patients with urinary tract infections. *Infect. Immun.*; **61**: 1307–1314.
- KOCH A.E., POLVERINI P.J., KUNKEL S.L. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*; **258**: 1798–1801.
- KONIECZNY B.T., DAI Z., ELWOOD E.T. *et al.* (1998). IFN- γ is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J. Immunol.*; **160**: 2059–2064.
- KONTOYIANNIS D., PASPARAKIS M., PIZARRO T.T., COMINELLI F., KOLLIAS G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF α biosynthesis in mice lacking TNF α AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*; **10**: 387–398.

- KOPF M., BAUMANN H., FREER G., FREUDENBERG M., LAMERS M., KISHIMOTO T., ZINKERNAGEL R., BLUETHMANN H., KOHLER G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*; **368**: 339–342.
- KOPF M., LEGROS G., COYLES A.J., KOSCOVILBOIS M., BROMBACHER F. (1995). Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6, deficient mice. *Immunol. Rev.*; **148**: 45–69.
- KOPF M., HERREN S., WILES V.M., PEPYS B.M., KOSCO-VIBOIS H.M. (1998). Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J. Exp. Med.*; **188**: 1895–1906.
- KOPPELMAN B., NEEFJES J.J., DE VRIES J.E., DE WAAL MALEFYT R. (1997). Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity*; **7**: 861–871.
- KOTB M., (1995). Bacterial exotoxins as superantigens. C. in *Microbial Rev*; **8**: 411-426.
- KRAMER S.M., CARVER M.E. (1986). Serum-free in vitro bioassay for the detection of tumor necrosis factor. *J. Immunol. Meth.*; **93**: 201–206.
- KRAMER S.M., AGGARWAL. B.B., EESSALU T.E., MCCABE S.M., FERRAIOLO B.L., FIGARI I.S., PALLADINO M. A. JR. (1988). Characterization of the in vitro and in vivo species preference of human and murine tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Res.*; **48**: 920–925.
- KRUSE N., TONY H.P., SEBALD W. (1993). Two distinct functional sites of human IL-4 are identified by variants impaired in either receptor binding or receptor activation. *EMBO J.*; **12**: 5121–5129.
- KUBIN M., KAMOUN M., TRINCHIER, G. (1994). Interleukin-12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production by human T cells. *J. Exp. Med.*; **180**: 263–274.
- KUDO C., ARAKI A., MATSUSHIMA K. (1991). Inhibition of IL-8-induced W3/25+ (CD4+) T lymphocyte recruitment into subcutaneous tissues of rats by selective depletion of in vivo neutrophils with a monoclonal antibody. *J. Immunol.*; **147**: 2196–2201.
- KUHN R., LOHLER J., RENNICK D., RAJEWSKY K., MULLER W. (1993). Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*; **75**: 263–274.
- KUNDIG T.M., SCHORLE H., BACHMANN M.F., HENGARTNER H., ZINKERNAGEL R.M., HORAK I. (1993). Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science*; **262**: 1059–1061.
- KUNIMOTO D.Y., NORDAN R.P., STROBER W. (1989). IL-6 is a potent cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. *J. Immunol.*; **143**: 2230–2235.
- KURODA K., YAGI J., IMANISHI K., YAN X.J., LI X.Y., FUJIMAKI W., KATO H., MIYOSHI-AKIYAMA T., KUMAZAWA Y., ABE H., UCHIYAMA T. (1996). Implantation of IL-2-containing osmotic pump prolongs the survival of superantigen-reactive T cells expanded in mice injected with bacterial superantigen. *J. Immunol.*; **157**: 1422–1431.
- LAAN T.T., BULL S., PIRIE R.S., FINK-GREMMELS J. (2005). Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide, *Aspergillus fumigatus*, and a suspension of hay dust. *Am J Vet Res.*; **66**(9): 1584-9.
- LACK G., RENZ H., SALOGA J. *et al.* (1994). Nebulized but not parenteral IFN- γ decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. *J. Immunol.*; **152**: 2546–2554.
- LACRAZ S., NICOD L.P., CHICHEPORTICHE R., WELGUS H.G., DAYER J.M. (1995). IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.*; **96**: 2304–2310.
- LAGE R.S., OLIVEIRA G.C., BUSEK S.V., GUERRA L.L., GIUNCHETTI R.C., CORREA-OLIVEIRA R., REIS A.B. (2007). Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.*; **115**:134-145.

- LAHOUSSA H., MOUSSAY E., RAINARD P., RIOLLET C. (2007). Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*; 12-21.
- LAMBOT M., DOUART A., JORIS E., LETESSON J.J., PASTORET P.P.(1997). Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol.*; **78**: 1041-1047.
- LAMBRIOLA-TOMKINS E., CHANDRAN C., VARNELL T.A., MADISON V.S., JU G. (1993). Structure-function analysis of human IL-1 β : identification of residues required for binding to the human type I IL-1 β receptor. *Protein Eng.*; **6**: 535-539.
- LANDOLFO S., GARIGLIO M., GRIBAUDO G., JEMMA C., GIOVARELLI M., CAVALLO G. (1988). Interferon- γ is not an antiviral, but a growth-promoting factor for T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*; **18**: 503-509.
- LANGSTEIN H.N., DOHERTY G.M., FRAKER D.L., BURESH C.M., NORTON J.A. (1991). The roles of interferon and tumor necrosis factor in an experimental rat model of cancer cachexia. *Cancer Res.*; **51**: 2302-2306.
- LANIER L.L., O'FALLON S., SOMOZA C., PHILLIPS J.H., LINSLEY P.S., OKUMURA K., ITO D., AZUMA M. (1995). CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol.*; **154**(1): 97-105.
- LARNER A.C., PETRICOIN E.F., NAKAGAWA Y., FINBLOOM D.S. (1993). IL-4 attenuates the transcriptional activation of both IFN- γ - and IFN- γ -induced cellular gene expression in monocytes and monocytic cell lines. *J. Immunol.*; **150**: 1944-1950.
- LARSEN C.G., ANDERSON A.O., APPELLA E. (1989). The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*; **243**: 1464-1466.
- LARSEN C.G., THOMSEN M.K., GESSER B. (1995a). The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. *J. Immunol.*; **155**: 2151-2157.
- LARSEN C.G., THOMSEN M.K., GESSER B., THOMSEN P.D., DELEURAN B.W., NOWAK J., SKODT V., THOMSEN H.K., DELEURAN M., THESTRUP-PEDERSEN K. *et al.* (1995b). The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody. *J Immunol.*; **155**(4): 2151-2157.
- LATERVEER L., LINDLEY I.J., HAMILTON M.S., WILLEMZE R., FIBBE W.E. (1995). Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood.*; **85**(8): 2269-2275.
- LAUGHLIN M.J., KIRKPATRICK G., SABISTON N., PETERS W., KURTZBERG J. (1993). Hematopoietic recovery following high-dose combined alkylating-agent chemotherapy and autologous bone marrow support in patients in phase I clinical trials of colony stimulating factors: G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-2 and M-CSF. *Ann. Hematol.*; **67**: 267-276.
- LAVOIE J.P., MAGHNI K., DESNOYERS M., RAME T., MARTIN J.G., HAMID Q.A. (2001). Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; **164**: 1410-1413.
- LE J.M., FREDRICKSON G., REIS L.F., DIAMANTSTEIN T., HIRANO T., KISHIMOTO T., VILCEK J. (1988). Interleukin 2-dependent and interleukin 2-independent pathways of regulation of thymocyte function by interleukin 6. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **85**: 8643-8647.
- LECONTEL C., PARANT F., PARANT M. (1992). Indirect and selective down-regulation of tumor necrosis factor- α release by interleukin-1. *Immunobiol.*; **186**: 199-213.
- LEE M.S., WOGENSEN L., SHIZURU J., OLDSTONE M.B., SARVETNICK N. (1994). Pancreatic islet production of murine interleukin-10 does not inhibit immune-mediated tissue destruction. *J. Clin. Invest.*; **93**: 1332-1338.

- LEE M.S., MUELLER R., WICKER L.S., PETERSON L.B., SARVETNICK N. (1996). IL-10 is necessary and sufficient for autoimmune diabetes in conjunction with NOD MHC homozygosity. *J. Exp. Med.*; **183**: 2663–2668.
- LEENEN P.J.M., CANONO B.P., DREVETS D.A., VOERMAN J.S.A., CAMPBELL P.A. (1994). TNF- α and IFN- γ stimulate a macrophage precursor cell line to kill *Listeria monocytogenes* in a nitric oxide- independent manner. *J. Immunol.*; **153**: 5141–5147.
- LEFF J.A., BAER J.W., KIRKMAN J.M. E. B.M., SHANLEY P.F., CHO P.F., OSTRO M.J., REPINE J.E. (1994). Liposome entrapped PGE-1 post-treatment decreases IL-1 β -induced neutrophil accumulation and lung leak in rats. *J. Appl. Physiol.*; **76**: 151–157.
- LEGUILLETTE R. (2003). Recurrent airway obstruction-heaves. *Vet. Clin. Equine*; **19**: 63-86.
- LEHMANN A.K., HALSTENSEN A., SORNES S., ROKKE O., WAAGE A. (1995). High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect. Immun.*; **63**: 2109–2112.
- LEJEUNE F.J., RUEGG C., LIENARD D. (1998). Clinical applications of TNF α -alpha in cancer. *Curr. Opin. Immunol.*; **10**: 573–580.
- LEONARD W.J. (1999) in *Fundamental Immunology* (Paul, W.E. ed) 4^o edizione, pp, 741-774, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
- LEUTENEGGER C.M., ALLUWAIMI A.M., SMITH W.L., PERANI L., CULLOR J.S. (2000). Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.*; **77(3-4)**: 275-287.
- LEVY M.M., FINK M.P., MARSHALL J.C., ABRAHAM E., ANGUS D., COOK D., COHEN J., OPAL S.M., VINCENT J.L., RAMSAY G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* **31**:1250-1256.
- LEVY Y., BROUET J.C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Invest.*; **93**: 424–428.
- LEWIS D.B., LIGGITT H.D., EFFMANN E.L., MOTLEY S.T., TEITELBAUM S.L., JEPSEN K.J., GOLDSTEIN S.A., BONADIO J., CARPENTER J., PERLMUTTER R.M. (1993). Osteoporosis induced in mice by overproduction of IL-4. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **90**: 11618–11622.
- LI J.T. C., YUNGINGER J.W., JAFFE H.S., NELSON D.R., GLEICH G.J. (1990). Lack of suppression of IgE production by recombinant interferon γ : a controlled trial in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*; **85**: 934–940.
- LI L., ELLIOTT J.F., MOSMANN T.R. (1994). IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.*; **153**: 3967–3978.
- LI M., DAVEY G.M., SUTHERLAND R.M., KURTS C., LEW A.M., HIRST C., CARBONE F.R., HEATH W.R. (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol.*; **166(10)**: 6099-103.
- LIENARD D., EWALENKO P., DELMOTTE J.J., RENARD N., LEJEUNE F.J. (1992). High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J. Clin. Oncol.*; **10**: 52–60.
- LIEW F.Y., LI Y., MILLOTT S. (1990). Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.*; **145**: 4306–4310.
- LINSCHIED P., SEBOEK D., NYLEN ES., LANGER I., SCHLATTER M., BECKER KL., KELLER U., MULLER B. (2003). In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology*; **144**: 5578-5584.
- LINSCHIED P., SEBOEK D., SCHAER D.J., ZULEWSKI H., KELLER U., MULLER B. (2004). Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit Care Med.*; **32**: 1715–1721.

- LIU C.C., JOAG S.V., KWON B.S., YOUNG J.D. (1990). Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J. Immunol.*; **144**: 1196–1201.
- LIU C.C., RAFII S., KOIZUMI H., GRANELLI-PIPERNO A., YOUNG J.D. (1992). Perforin gene expression in stimulated human peripheral blood T cells studied by in situ hybridization and northern blotting analysis. *Immunol. Lett.*; **33**: 79–85.
- LIU F., POURSINE-LAURENT J., WU H.Y., LINK D.C. (1997). Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation. *Blood*; **90**: 2583–2590.
- LIU Y., JANEWAY C. A. JR. (1990). Interferon plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J. Exp. Med.*; **172**: 1735–1739.
- LIU Y., DE WAAL MALEFYT R., BRIERE F., PARHAM C., BRIDON J.-M., BANCHEREAU J., MOORE K.W., XU J. (1997). The Epstein-Barr virus interleukin-10 (IL-10) homolog is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J. Immunol.*; **158**: 604–613.
- LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*.; **25(4)**: 402-8.
- LLORENTE L., RICHAUD-PATIN Y., FIOR R., ALCOCER-VARELA J., WIJDENES J., FOURRIER B. M., GALANAUD P., EMILIE D. (1994). In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum.*; **37**: 1647–1655.
- LLORENTE L., ZOU W., LEVY Y., RICHAUD-PATIN Y., WIJDENES J., ALCOCER-VARELA J., MOREL-FOURRIER B., BROUET J.C., ALARCON-SEGOVIA D., GALANAUD P. (1995). Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*; **181**: 839–844.
- LOPES M.F., DOSREIS G.A. (1995). Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res.*; **28 (8)**: 913-8.
- LOPPNOW H., LIBBY P. (1990). Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J. Clin. Invest.*; **85**: 731–738.
- LORENZ H.M., ANTONI C., VALERIUS T., REPP R., GRUNKE M., SCHWERDTNER N., NUSSLEIN H., WOODY J., KALDEN J.R., MANGER B. (1996). In vivo blockade of TNF alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis – Short term cellular and molecular effects. *J. Immunol.*; **156**: 1646–1653.
- LOTEM J., SHABO Y., SACHS L. (1989). Regulation of megakaryocyte development by interleukin-6. *Blood*; **74**: 1545–1551.
- LOTZ M., JIRIK F., KABOURIDIS P., TSOUKAS C., HIRANO T., KISHIMOTO T., CARSON D.A. (1988). B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.*; **167**: 1253–1258.
- LOTZE M.T., MATORY Y.L., ETTINGHAUSEN S.E., RAYNER A.A., SHARROW S.O., SEIPP C.A., CUSTER M.C., ROSENBERG S.A. (1985). In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J. Immunol.*; **135**: 2865–2875.
- LOUGHLIN A.J., WOODROOFE M.N., CUZNER M.L. (1992). Regulation of Fc receptor and major histocompatibility complex antigen expression on isolated rat microglia by tumour necrosis factor, interleukin-1 and lipopolysaccharide: effects on interferon- γ induced activation. *Immunology*; **75**: 170–175.
- LOVETT-RACKE A. E., HUSSAIN R. Z., NORTHROP S., CHOY J., ROCCHINI A., MATTHES L., CHAVIS J. A., DIAB A., DREW P. D., RACKE M. K. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor - α agonists as therapy for autoimmune disease. *J. Immunol.*; **172**: 5790–5798.

- LUCIN P., PAVIC I., POLIC B., KOSZINOWSKI U.H. (1992). Interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J. Virol.*; **66**: 1977–1984.
- LUDEWIG B., GRAF D., GELDERBLOM H.R., BECKER Y., KROCZEK R.A., PAULI G. (1995). Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF α -alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.*; **25**: 1943–1950.
- LUSTER A.D., UNKELESS J.C., RAVETCH J.V. (1985). Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*; **315**: 672.
- LUZZANI A., POLATI E., DORIZZI R., RUNGATSCHER A., PAVAN R., MERLINI A. (2003). Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med.*; **31**: 1737-1741.
- MA Y., HURST H.E., FERNANDEZ-BOTRAN R. (1996). Soluble cytokine receptors as carrier proteins: effects of soluble IL-4 receptors on the pharmacokinetics of murine IL-4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; **279**: 340–350.
- MAAR S.P. (2004). Emergency care in pediatric septic shock. *Pediatr Emerg Care.*; **20(9)**: 617-24.
- MACIEJEWSKI J.P., SELLERI C., SATO T., CHO H.J., KEEFER L.K., NATHAN C.F. (1995). Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *J. Clin. Invest.*; **96**: 1085–1092.
- MACNAUL K.L., HUTCHINSON N.I., PARSONS J.N., BAYNE E.K., TOCCI M.J. (1990). Analysis of IL-1 and TNF α -alpha gene expression in human rheumatoid synoviocytes and normal monocytes by in situ hybridization. *J. Immunol.*; **145**: 4154–4166.
- MACNEIL I., SUDA T., MOORE K.W., MOSMANN T.R., ZLOTNIK A. (1990). IL-10: a novel cytokine growth cofactor for mature and immature T cells. *J. Immunol.*; **145**: 4167–4173.
- MAEGELE M., RIESS P., SAUERLAND S., BOUILLON B., HESS S., MCINTOSH T.K., MAUTES A., BROCKMANN M., KOEBKE J., KNIFKA J. (2005). Characterization of a new rat model of experimental combined neurotrauma. *Shock*; **23**: 476-481.
- MAHANTY S., NUTMAN T.B. (1995). Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of interleukin 10. *Parasite Immunol.*; **17**: 385–392.
- MAHANTY S., MOLLIS S.N., RAVICHANDRAN M., ABRAMS J.S., KUMARASWAMI V., JAYARAMAN K., OTTESEN E.A., NUTMAN T.B. (1996). High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis. *J. Infect. Dis.*; **173**: 769–773.
- MAIER B., LEHNERT M., LAURER H.L., MAUTES A.E., STEUDEL W.I., MARZI I. (2006). Delayed elevation of soluble tumor necrosis factor receptors p75 and p55 in cerebrospinal fluid and plasma after traumatic brain injury. *Shock*; **26**: 122-127.
- MAIONE D., DI CARLO E., LI W., MUSIANI P., MODESTI A., PETERS M., ROSE-JOHN S., DELLA ROCCA C., TRIPODI M., LAZZARO D., TAUB R., SAVINO R., CILIBERTO G. (1998). Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *EMBO J.*; **17**: 5588–5597.
- MAK T.W., SAUNDERS M.E. (2006). Perspective on immunity and immunology. In *The immune response: basic and clinical principles*. Elsevier Inc., pag. 7-13.
- MALISAN F., BRIERE F., BRIDON J. M., HARINDRANATH N., MILLS F.C., MAX E.E., BANCHEREAU J., MARTINEZ-VALDEZ H. (1996). Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J. Exp. Med.*; **183**: 937–947.
- MANCUSO G., TOMASELLO F., MIGLIARDO M., DELFINO D., COCHRAN J., COOK J.A., TETI G. (1994). Beneficial effects of interleukin-6 in neonatal mouse models of group B streptococcal disease. *Infect Immun.*; **62**: 4997-5002.
- MANETTI R., PARRONCHI P., GUIDIZI M. G. *et al.* (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.*; **177**: 1199–1204.

- MANOURY-SCHWARZ B., CHIOCCHIA G., BESSIS N. *et al.* (1997). High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- γ receptors. *J. Immunol.*; **158**: 5501–5506.
- MANTIONE N.L., OTTO C.M. (2005). Characterization of the use of antiemetic agents in dogs with parvoviral enteritis treated at a veterinary teaching hospital: 77 cases (1997-2000). *J Am Vet Med Assoc.*; **227**: 1787-1793.
- MARCATO P.S. (2000). Patogenesi cellulare e molecolare di fenomeni infiammatori. In *Anatomia e istologia patologica veterinaria*, terza ed. Società editrice Esculapio.
- MARCHANT A., BRUYNS C., VANDENABEELE P., DUCARME M., GERARD C., DELVAUX A., DE GROOTE D., ABRAMOWICZ D., VELU T., GOLDMAN M. (1994a). Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur. J. Immunol.*; **24**: 1167–1171.
- MARFAING-KOKA A., DEVERGNE O., GORGONE G. *et al.* (1995). Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells: Synergistic induction by IFN- γ plus TNF- α and inhibition by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.*; **154**: 1870– 1878.
- MARFAING-KOKA A., MARAVIC M., HUMBERT M., GALANAUD P., EMILIE D. (1996). Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *Int. Immunol.* ; **8**: 1587–1594.
- MARIE C., PITTON C., FITTING C., CAVAILLON J.M. (1996). IL-10 and IL-4 synergize with TNF alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine*; **8**: 147–151.
- MARIE C., FITTING C., CHEVAL C., LOSSER M.L., CARLET J., PAYEN D., FOSTER K., CAVAILLON J.M. (1997). Presence of high levels of leukocyte-associated interleukin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome. *Infect Immun.*; **65**: 865-871.
- MARINO M.W., DUNN A., GRAIL D., INGLESE M., NOGUCHI Y., RICHARDS E., JUNGBLUTH. A., WADA H., MOORE M., WILLIAMSON B., BASU S., OLD L.J. (1997). Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **94**: 8093–8098.
- MARRACK P., KAPPLER J., (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *J Exp Med*; **248**: 1066.
- MARSH D.G., NEELY J.D., BREAZEALE D.R., GHOSH, B., FREIDHOFF L.R., EHRlich-KAUTZK E., SCHOU C., KRISHNASWAMY G., BEATY T.H. (1994). Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum IgE concentrations. *Science*; **264**: 1152–1156.
- MARSHALL J.C. (2005). Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med.*; **33**: 503-505.
- MARUNA P., NEDELNIKOVA K., GURLICH R. (2000). Physiology and genetics of procalcitonin. *Physiol Res.*; **49**: 57-61.
- MARX N., KEHRLE B., KOHLHAMMER K., GRUB M., KOENIG W., HOMBACH V., LIBBY P., PLUTZKY J. (2002) PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ. Res.*; **90**: 703–710.
- MARX N., SUKHOVA G., COLLINS T., LIBBY P., PLUTZKY J. (1999) PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*; **99**: 3125–3131.
- MATSUDA N., HATTORI Y. (2006). Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci.*; **101**:189-198.
- MATSUMOTO T., IKEDA K., MUKAIDA N. (1997). Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab. Invest.*; **77**: 119–125.
- MATSUNO H., SAWAI T., NAZUKA T., UZAKI M., TSUJI H., NISHIMOTO N., YOSHIZAKI K. (1998). Treatment of rheumatoid synovitis with anti-reshaping human interleukin-6 receptor monoclonal antibody: use of rheumatoid arthritis tissue implants in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum.*; **41**: 2014–2021.

- MATSUYAMA Y., SATO K., KAMIYA M., YANO J., IWATA H., ISOBE K.: (1998). Nitric oxide: a possible etiologic factor in spinal cord cavitation. *J Spinal Disord*; **11**: 248-252.
- MATTHYS P., HEREMANS H., OPDENAKKER G., BILLIAU A. (1991a). Anti-interferon- γ -antibody treatment, growth of Lewis lung tumors in mice and tumor-associated cachexia. *Eur. J. Cancer*; **27**: 182–187.
- MATTHYS P., DIJKMANS R., PROOST P. *et al.* (1991b). Severe cachexia in mice inoculated with interferon- γ -producing tumor cells. *Int. J. Cancer*; **49**: 77–82.
- MATTHYS P., DILLEN C., PROOST P., HEREMANS H., VAN DAMME J., BILLIAU A. (1993). Modification of the anti-CD3-induced cytokine release syndrome by anti-interferon- γ or anti-interleukin-6 antibody treatment: protective effects and biphasic changes in blood cytokine levels. *Eur. J. Immunol.*; **23**: 2209–2216.
- MATTHYS P., FROYEN G., HUANG S. *et al.* (1995a). Interferon- γ receptor-deficient mice are hypersensitive to the anti-CD3-induced cytokine release syndrome and thymocyte apoptosis: Protective role of endogenous nitric oxide. *J. Immunol.*; **155**: 3823–3829.
- MATTHYS P., MITERA T., HEREMANS H., VAN DAMME J., BILLIAU A. (1995b). Anti-IFN- γ and anti-IL-6 antibodies affect staphylococcal enterotoxin B-induced weight loss, hypoglycemia and cytokine release in D-galactosamine-sensitized and unsensitized mice. *Infect. Immun.* **63**: 1158–1164.
- MAULIK N., ENGELMAN R.M., WEI Z., LU D., ROUSOU J.A., DAS D.K. (1993). Interleukin-1 preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation*; **88**: 387–394.
- MAYER J., WOODS M.L., VAVRIN Z., HIBBS JR. J.B. (1993). Interferon-induced nitric oxide production reduces Chlamydia trachomatis infectivity in McCoy cells. *Infect. Immun.*; **61**: 491–497.
- MCCAFFERY P.G., LUO C., KERPPOLA T.K., JAIN J., BADALIAN T.M., HO A.M., BURGEON E., LANE W.S., LAMBERT J.N., CURRAN T., VERDINE G.L., RAO A., HOGAN P.G. (1993). Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science*; **262**: 750–754.
- MCCARRON R.M., WANG L., RACKE M.K., MCFARLIN D.E., SPATZ M. (1993). Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.*; **43**: 23–30.
- MCCORMICK J.K., YARWOOD J.M., SCHLIEVERT P.M., (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol*; **55**: 77-104.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M., HALLIWELL R.E.W. (1993). Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after “natural (hay and straw)” challenges. *Vet. Immun. Immunopath.*; **36**: 202-222.
- McMICHAEL M., MOORE R.M. (2004). Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. *J Vet Emerg Crit Care.*; **14**: 231-241.
- MCTIGUE D.M., POPOVICH P.G., JAKEMAN L.B., STOKES B.T. (2000). Strategies for spinal cord injury repair. *Prog Brain Res*; **128**: 3-8.
- MEDEIROS F., RIGL C.T., ANDERSON G.C., HALLING K.C. (2007). Tissue handling for genome-wide expression analysis: a review of the issues, evidence, and opportunities. *Arch Pathol Lab Med.*; **131**:1805-1816.
- MEHRAN R., QUISMORIO F.P. JR., STRASSMANN G., STIMMLER M.M., HORWITZ D.A., KITRIDOU R.C., GAUDERMAN W.J., MORRISON J., BRAUTBAR C., JACOB C.O. (1998). Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*; **41**: 596–602.
- MEISNER M. (2002). Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta.*; **323**:17-29.
- MEISNER M., MULLER V., KHAKPOUR Z., TOEGEL E., REDL H. (2003). Induction of procalcitonin and inflammatory cytokines in an hepatic baboon endotoxin shock model. *Shock.*; **19**: 187-190.

- MELROSE J., TSURUSHITA N., LIU G., BERG E.L. (1998). IFN- γ inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J. Immunol.*; **161**: 2457–2464.
- MELVIN A.J., MCGURN M.E., BORT S.J., GIBSON C., LEWIS D.B. (1995). Hypomethylation of the interferon- γ gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. *Eur. J. Immunol.*; **25**: 426–430.
- MERRILL J.E., IGNARRO L.J., SHERMAN M.P., MELINEK J., LANE T.E. (1993). Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J. Immunol.*; **151**: 2132–2141.
- MERRIMAN C.R., PULLIAM L.A., KAMPSCHMIDT R.F. (1977). Comparison of leukocytic pyrogen and leukocytic endogenous mediator. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; **154**: 224–227.
- MERTZ P.M., DEWITT D.L., STETLER-STEVENSON W.G., WAHL L.M. (1994). Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J. Biol. Chem.*; **269**: 21322–21329.
- MERVILLE P., DECHANET J., GROUARD G., DURAND I., BANCHEREAU J. (1995). T cell-induced B cell blasts differentiate into plasma cells when cultured on bone marrow stroma with IL-3 and IL-10. *Int. Immunol.*; **7**: 635–643.
- MEUER S.C., HUSSEY R.E., CANTRELL D.A., HODGEN J.C., SCHLOSSMAN S.F., SMITH K.A., REINHERZ E.L. (1984). Triggering the T3–Ti antigen-receptor complex results in clonal T cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **81**: 1509–1513.
- MICHALOPOULOS K.G., DEFRANCES C.M. (1997). Liver regeneration. *Science*; **276**: 60–66.
- MIDDLETON J., NEIL S., WINTLE J., CLARK-LEWIS I., MOORE H., LAM C., AUER M., HUB E., ROT A. (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*; **91**(3): 385–395.
- MIETHKE T., WAHL C., HEEG K., ECHTENACHER B., KRAMMER P.H., WAGNER H., (1992). T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*; **175**: 91–98.
- MILENO M.D., MARGOLIS N.H., CLARK B.D., DINARELLO C.A., BURKE J.F., GELFAND J.A. (1995). Coagulation of whole blood stimulates interleukin-1 gene expression: absence of gene transcripts in anticoagulated blood. *J. Infect. Dis.*; **172**: 308–311.
- MILES S.A., REZAI A.R., SALAZAR GONZALEZ J.F., VANDER MEYDEN M., STEVENS R.H., LOGAN D.M., MITSUYASU R.T., TAGA T., HIRANO T., KISHIMOTO T., MARTINEZ-MAZA O. (1990). AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **87**: 4068–4072.
- MILLER L.C., ISA S., VANNIER E., GEORGILIS K., STEERE A.C., DINARELLO C.A. (1992). Live *Borrelia burgdorferi* preferentially activate IL-1 β gene expression and protein synthesis over the interleukin-1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.*; **90**: 906–912.
- MINTY A., CHALON P., DEROCQ J.M., DUMONT X., GUILLEMOT J.C., KAGHAD M., LABIT C., LEPLATOIS P., LIAUZUN P., MILOUX B., MINTY C., CASELLAS P., LOISON G., LUPKER J., SHIRE D., FERRARA P., CAPUT D. (1993). Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*; **362**: 248–250.
- MIOSSEC P., ZIFF M. (1986). Immune interferon enhances the production of interleukin 1 by human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J. Immunol.*; **137**: 2848–2852.
- MITAKA C. (2005). Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta.*; **351**: 17–29.
- MITRA R.S., JUDGE T.A., NESTLE F.O., TURKA L.A., NICKOLOFF B.J. (1995). Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J. Immunol.*; **154**: 2668–2677.

- MOCHIZUKI M., SAN GABRIEL M.C., NAKATANI H., YOSHIDA M., HARASAWA R. (1993). Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemoagglutination assay for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci.*; **55**: 60-63.
- MOCK C.N., DRIES D.J., JURKOVICH G.J., MAIER R.V. (1996). Assessment of two clinical trials: interferon-gamma therapy in severe injury. *Shock*; **5**: 235–240.
- MONCADA S., HIGGS A. (1993). Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*; **329**: 2002–2012.
- MOORE K.W., VIEIRA P., FIORENTINO D.F., TROUNSTINE M.L., KHAN T.A., MOSMANN T.R. (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr Virus gene BCRF1. *Science*; **248**: 1230–1234.
- MOORE K.W., O’GARRA A., DE WAAL MALEFYT R., VIEIRA P., MOSMANN T.R. (1993). Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.*; **11**: 165–190.
- MOORE P.S., BOSHOFF C., WEISS R.A., CHANG Y. (1996). Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*; **274**: 1739–1744.
- MOORE R.J., OWENS D.M., STAMP G., ARNOTT C., BURKE F., EAST N., HOLDSWORTH H., TURNER L., ROLLINS B., PASPARAKIS M., KOLLIAS G., BALKWILL F. (1999). Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nature Med.*; **5**: 828–831.
- MOR N., GOREN M.B., CROWLE A.J. (1989). Enhancement of growth of Mycobacterium lepraemurium in macrophages by interferon. *Infect. Immun.*; **57**: 2586–2587.
- MORAWETZ R.A., GABRIELE L., RIZZO L.V., NOBEN-TRAUTH N., KUHN R., RAJEWSKY K., MULLER W., DOHERTY T.M., FINKELMAN F., COFFMAN R.L., MORSE H.C. (1996). IL-4-independent immunoglobulin class switch to IgE in the mouse. *J. Exp. Med.*; **184**: 1651–1661.
- MOREB J., ZUCALI J.R., WEINER R.S. (1989). The role of interleukin 3 and interleukin 6 in the protection from 4-hydroperoxycyclophosphamide and the proliferation of early human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*; **17**: 1022–1027.
- MOREB J., ZUCALI J.R. (1992). The therapeutic potential of interleukin-1 and tumor necrosis factor on hematopoietic stem cells. *Leuk. Lymphoma*; **8**: 267–275.
- MORGENTHALER N.G., STRUCK J., CHANCERELLE Y., WEGLOHNER W., AGAY D., BOHUON C., SUAREZ-DOMENECH V., BERGMANN A., MULLER B. (2003). Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res.*; **35**: 290–295.
- MORINOBU A., KUMAGAI S., YANAGIDA H., OTA H., ISHIDA H., MATSUI M., YODOI J., NAKAO K. (1996). IL-10 suppresses cell surface CD23/Fc epsilon RII expression, not by enhancing soluble CD23 release, but by reducing CD23 mRNA expression in human monocytes. *J. Clin. Immunol.*; **16**: 326–333.
- MORITANI M., YOSHIMOTO K., TASHIRO F., HASHIMOTO C., MIYAZAKI J., II S., KUDO E., IWAHANA H., HAYASHI Y., SANO T. (1994). Transgenic expression of IL-10 in pancreatic islet A cells accelerates autoimmune insulinitis and diabetes in non-obese diabetic mice. *Int. Immunol.*; **6**: 1927–1936.
- MORITANI M., YOSHIMOTO K., II S., KONDOM., IWAHANA H., YAMAOKA T., SANO T., NAKANO N., KIKUTANI H., ITAKURA M. (1996). Prevention of adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice with IL-10-transduced islet-specific TH1 lymphocytes. A gene therapy model for autoimmune diabetes. *J. Clin. Invest.*; **98**: 1851–1859.
- MOSSER D.M., HANDMAN E. (1992). Treatment of murine macrophages with interferon- γ inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J. Leukoc. Biol.*; **52**: 369–376.
- MROCZKO B., SZMITKOWSKI M. (2004). Hematopoietic cytokines as tumor markers. *Clin Chem Lab Med.*; **42** (12): 1347-54.

- MUELLER R., LEE M.S., SAWYER S.P., SARVETNICK N. (1996). Transgenic expression of interleukin 10 in the pancreas renders resistant mice susceptible to low dose streptozotocin-induced diabetes. *J. Autoimmun.*; **9**: 151–158.
- MUKHOPADHYAY A., NI J., ZHAI Y., YU G.L., AGGARWAL B.B. (1999). Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF α homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*; **274**: 15978–15981.
- MULLANE K. M., KRAEMER R., SMITH B. (1985) Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Methods*; **14**: 157–167.
- MULLER B., WHITE J.C., NYLEN E.S., SNIDER R.H., BECKER K.L., HABENER J.F. (2001). Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.*; **86**: 396–404.
- MULLER W., RAJEWSKY K., KUHN R. (1994). IL-4-deficient mice. *Res. Immunol.*; **144**: 637–638.
- MUNN D.H., BEALL A.C., SONG D., WRENN R.W., THROCKMORTON D.C. (1995). Activation-induced apoptosis in human macrophages: Developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon . *J. Exp. Med.*; **181**: 127–136.
- MURAGUCHI A., KISHIMOTO T., MIKI Y., KURITANI T., KAIEDA T., YOSHIZAKI K., YAMAMURA Y. (1981). T CELL-REPLACING FACTOR- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J. Immunol.*; **127**: 412–416.
- MURALI-KRISHNA K., ALTMAN J.D., SURESH M., SOURDIVE D.J., ZAJAC A.J., MILLER J.D., SLANSKY J., AHMED R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*; **8**: 1771–1787.
- MURAYAMA T., KUNO K., JISAKI F., OBUCHI M., SAKAMURO D., FURUKAWA T., MUKAIDA N., MATSUSHIMA K. (1994). Enhancement human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8. *J Virol.*; **68(11)**: 7582-5.
- MURPHY G. J., HOLDER J. C. (2000) PPAR- α agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.*; **21**: 469–474.
- MURPHY K.M., HEIMBERGER A.B., LOH D.Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science*; **250**: 1720.
- MURPHY T.J., PATERSON H.M., MANNICK J.A., LEDERER J.A. (2004). Injury, sepsis and the regulation of Toll-like receptor responses. *J Leuk Biol.*; **75**: 400-407.
- MURRAY H.W., SZURO-SUDOL A., WELLNER D. *et al.* (1989). Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of interferon-stimulated human macrophages. *Infect. Immun.*; **57**: 845–849.
- MURZIN A.G., LESK A.M., CHOTHIA C. (1992). Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 and 1 and fibroblast growth factors. *J. Mol. Biol.*; **223**: 531–543.
- NABATA T., MORIMOTO S., KOH E., SHIRAIISHI T., OGIHARA T. (1990). Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Int.*; **20**: 445–453.
- NABIOULLIN R., SONE S., MIZUNO K., YANO S., NISHIOKA Y., HAKU T., OGURA T. (1994). Interleukin-10 is a potent inhibitor of tumor cytotoxicity by human monocytes and alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.*; **55**: 437–442.
- NAITOH Y., FUKATA J., TOMINAGA T., NAKAI Y., TAMAI S., MORI K., IMURA H. (1988). Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **155**: 1459–1463.
- NAKAGAWA T., HIRANO T., NAKAGAWA N., YOOSHIZAKI K., KISHIMOTO T. (1985). Effect of recombinant IL-2 and IFN- γ on proliferation and differentiation of human B cells. *J. Immunol.*; **134**: 959–966.

- NAKANE A., NISHIKAWA S., SASAKI S. *et al.* (1996). Endogenous interleukin-4, but not interleukin-10, is involved in suppression of host resistance against *Listeria monocytogenes* infection in interferon-depleted mice. *Infect. Immun.*; **64**: 1252–1258.
- NANDURI V.B., HULMES J.D., PAN Y.C., KILIAN P.L., STERN A.S. (1991). The role of arginine residues in interleukin 1 receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta*; **1118**: 25–35.
- NANTEL F., DENIS D., GORDON R., NORTHEY A., CIRINO M., METTERS K. M., CHAN C. C. (1999) Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.*; **128**: 853–859.
- NARAY FEJES-TOTH A., GUYRE P.M. (1984). Recombinant human immune interferon induces increased IgE receptor expression on the human monocyte cell line U-937. *J. Immunol.*; **133**: 1914–1919.
- NARHI L.O., PHILO J.S., LI T., ZHANG M., SAMAL B., ARAKAWA T. (1996). Induction of alpha-helix in the beta-sheet protein tumor necrosis factor-alpha: acid-induced denaturation. *Biochemistry*; **35**: 11454–11460.
- NATHAN C., MURRAY H.W., WIEBE M.E., RUBIN B.Y. (1983). Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.*; **158**: 670–681.
- NATIONAL MASTITIS CONCIL (NMC). (1999). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis Madison WI, National Mastitis Concil Inc.
- NAVIKAS V., LINK J., PALASIK W., SODERSTROM M., FREDRIKSON S., OLSSON T., LINK H. (1995). Increased mRNA expression of IL-10 in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Scand. J. Immunol.*; **41**: 171–178.
- NEIPEL F., ALBRECHT J.C., ENSSER A., HUANG Y.Q., LI J.J., FRIEDMAN-KIEN A.E., FLECKENSTEIN B. (1997). Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J. Virol.*; **71**: 839–842.
- NEMUNAITIS J., APPELBAUM F.R., LILLEBY K., BUHLES W.C., ROSENFELD C., ZEIGLER Z.R., SHADDUCK R.K., SINGER J.W., MEYER W., BUCKNER C.D. (1994). Phase I study of recombinant interleukin-1 in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*; **83**: 3473–3479.
- NESIC-TAYLOR O., CITTELLY D., YE Z., XU G.Y., UNABIA G., LEE J.C., SVRAKIC N.M., LIU X.H., YOULE R.J., WOOD T.G. *et al.* (2005). Exogenous Bcl-xL fusion protein spares neurons after spinal cord injury. *J Neurosci Res*; **79**: 628–637.
- NETA R., OPPENHEIM J.J., WANG J.-M., SNAPPER C.M., MOORMAN M.A., DUBOIS C.M. (1994). Synergy of IL-1 β and stem cell factor in radioprotection of mice is associated with IL-1 β up-regulation of mRNA and protein expression for c-kit on bone marrow cells. *J. Immunol.*; **153**: 1536–1543.
- NEUMANN H., SCHMIDT H., WILHARM E., BEHRENS L., WEKERLE H. (1997). Interferon gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J. Exp. Med.*; **186**: 2023–2031.
- NEURATH M., FUSS I., PASPARAKIS M., ALEXOPOULOU L., HARALAMBOUS S., MEYER ZUM BUSCHENFELDE K.H., STRONER K., KOLLIAS G. (1997). Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur. J. Immunol.*; **27**: 1743–1750.
- NG W.Y., THAI A.C., LUI K.F., YEO P.P., CHEAH J.S. (1999). Systemic levels of cytokines and GAD-specific autoantibodies isotypes in Chinese IDDM patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.*; **43**: 127–135.
- NICHOLAS J., RUVOLO V., ZONG J., CIUFO D., GUO H.G., REITZ M.S., HAYWARD G.S. (1997a). A single 13-kilobase divergent locus in the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome contains nine open reading frames that are homologous to or related to cellular proteins. *J. Virol.*; **71**: 1963–1974.

- NICHOLAS J., RUVOLO V.R., BURNS W.H., SANDFORD G., WAN X., CIUFO D., HENDRICKSON S.B., GUO H.G., HAYWARD G.S., REITZ M.S. (1997b). Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature Med.*; **3**: 287–292.
- NICOLA N.A. (1994). Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells.*; **12** Suppl 1:3–12; discussion 12–4.
- NIIRO H., OTSUKA T., KUGA S., NEMOTO Y., ABE M., HARA N., NAKANO T., OGO T., NIHO Y. (1994). IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Int. Immunol.*; **6**: 661–664.
- NIIRO H., OTSUKA T., TANABE T., HARA S., KUGA S., NEMOTO Y., TANAKA Y., NAKASHIMA H., KITAJIMA S., ABE M. (1995). Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood*; **85**: 3736–3745.
- NIJSTEN M.W., DE GROOT E.R., TEN DUIS H.J., KLASSEN H.J., HACK C.E., AARDEN L.A. (1987). Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet*; **2**: 921.
- NISHIKURA T. (1999). Procalcitonin (PCT) production in a thyroidectomized patient. *Int Care Med.*; **25**: 1031.
- NISHIMOTO N., YOSHIZAKI K., TAGOH H., MONDEN M., KISHIMOTO S., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1989). Elevation of serum interleukin 6 prior to acute phase proteins on the inflammation by surgical operation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*; **50**, 399–401.
- NISHIMURAN., TOHYAMA C., SATOH M., NISHIMURA H., REEVE V.E. (1999). Defective immune response and severe skin damage following UVB irradiation in interleukin-6-deficient mice. *Immunology*; **97**: 77–83.
- NOMA T., DORF M.E. (1985). Modulation of suppressor T cell induction with interferon- γ . *J. Immunol.*; **135**: 3655–3660.
- NOMA T., MIZUTA T., ROSEN A., HIRANO T., KISHIMOTO T., HONJO T. (1987). Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines. *Immunol. Lett.*; **15**: 249–253.
- NORTHROP J.P., HO S.N., CHEN L., THOMAS D.J., TIMMERMAN L.A., NOLAN G.P., ADMON A., CRABTREE G.R. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T cell activation. *Nature*; **369**: 497–502.
- NOVELLI F., DI PIERRO F., DI CELLE P.F. *et al.* (1994). Environmental signals influencing expression of the IFN- γ receptor on human T cells control whether IFN- γ promotes proliferation or apoptosis. *J. Immunol.*; **152**: 496–504.
- NOWELL P.C. (1961). Inhibition of human leukocyte mitosis by prednisolone in vitro. *Cancer Res.*; **21**: 1518–1523.
- NYLEN E.S., WHANG K.T., SNIDER R.H., STEINWALD P.M., WHITE J.C., BECKER K.L. (1998). Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med.*; **26**:1001-1006.
- NYSTROM P.O. (1998). The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chem.*; **41** suppl.A: 1-7.
- O'GARRA A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*; **8**(3): 275-83.
- O'MALLEY W.E., ACHINSTEIN B., SHEAR M.J. (1962). Action of bacterial polysaccharide on tumors. II : damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide and induced tolerance. *J. Natl Cancer Inst.*; **29**: 1169–1175.
- OGAWA M. (1992). IL6 and haematopoietic stem cells. *Res. Immunol.*; **143**: 749–751.

OHMORI Y., HAMILTON T.A. (1994). IFN- γ selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*; **153**: 2204–2212.

OHSHIMA S., SAEKI Y., MIMA T., SASAI M., NISHIOKA S., NOMURA K., KOPF M., KATADA Y., TANAKA T., KISHOMOTO T. (1998). Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **95**: 8222–8226.

OKAMOTO H., IWAMOTO T., KOTAKE S., MOMOHARA S., YAMANAKA H., KAMATANI N. (2005). Inhibition of NF- κ B signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*; **23**: 323–330.

OKAMOTO S.-I., MUKAIDA N., YASUMOTO K. (1994). The interleukin-8 AP-1 and B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization. *J. Biol. Chem.*; **269**: 8582–8539.

OKAMURA H., TSUTSUI H., KOMATSU T., YUTSUDO M., HAKURA A., TANIMOTO T., TORIGOE K., OKURA T., NUKADA Y., HATTORI K., AKITA K., NAMBA M., TANABE F., KONISHI K., FUKUDA S., KURIMOTO M. (1995). Cloning of a new cytokine that induces interferon- γ . *Nature*; **378**: 88–91.

OKANO A., SUZUKI C., TAKATSUKI F., AKIYAMA Y., KOIKE K., OZAWA K., HIRANO T., KISHIMOTO T., NAKAHATA T., ASANO S. (1989b). In vitro expansion of the murine pluripotent hemopoietic stem cell population in response to interleukin 3 and interleukin 6. Application to bone marrow transplantation. *Transplantation*; **48**: 495–498.

OKANO S., YOSHIDA M., FUKUSHIMA U., HIGUCHI S., TAKASE K., HAGIO M. (2002). Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *Vet Rec.*; **150**: 245–246.

OKUDA Y., SAKODA S., BERNARD C.C., FUJIMURA H., SAEKI Y., KISHIMOTO T., YANAGIHARA T. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int. Immunol.*; **10**: 703–708.

OKUSAWA S., GELFAND J.A., IKEJIMA T., CONNOLLY R.J., DINARELLO C.A. (1988). Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Clin. Invest.*; **81**: 1162–1172.

ONISHI M., NOSAKA T., KITAMURA T. (1998). Cytokine receptors: structures and signal transduction. *Int Rev Immunol.*; **16 (5-6)** :617-34.

OPAL S.M., SCANNON P.J., VINCENT J.L., WITHE M., CARROLL S.F., PALARDY J.E., PAREJO N.A., PRIBBLE J.P., LEMKE J.H. (1999). Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.*; **180**: 1584–1589.

OPPENHEIM J.J., ZACHARIAE C.O., MUKAIDA N., MATSUSHIMA K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.*; **9**: 617–48.

ORLANDI A., CIUCCI A., FERLOSIO A., PELLEGRINO A., CHIARIELLO L., SPAGNOLI L.G. (2005). Increased expression and activity of matrix metalloproteinases characterize embolic cardiac myxomas. *Am J Pathol.*; **166 (6)**: 1619–28.

OROSZ P., ECHTENACHER B., FALK W., RUSCHOFF J., WEBER D., MANNEL D.N. (1993). Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*; **177**: 1391–1398.

OSWALDI.P., GAZZINELLI R.T., SHER A., JAMES S.L. (1992a). IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.*; **148**: 3578–3582.

OSWALDI P., WYNN T.A., SHER A., JAMES S.L. (1992b). Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **89**: 8676–8680.

- OTTENHOF T.H. M., MUTIS T. (1995). Role of cytotoxic cells in the protective immunity against and immunopathology of intracellular infections. *Eur. J. Clin. Invest.*; **25**: 371–377.
- OTTO C.M. (2007). Sepsis in veterinary patients: what do we know and where we can go? *J Vet Emerg Crit Care.*; **17**: 329-332.
- OTTO C.M., DROBATZ K.J., SORTER C. (1997). Endotoxemia and tumor necrosis factor in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med.*; **11**: 65-70.
- OTTO C.M., RIESER T.M., BROOKS M.B., RUSSELL M.W. (2000). Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *JAVMA*; **217**: 1500-1504.
- OTTO C.M., JACKSON C.B., ROGELL E.J., PRIOR R.B., AMMONS W.S. (2001). Recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI21) for treatment of parvovirus enteritis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J Vet Intern Med.*; **15**: 355-360.
- OVERBERGH L., GIULIETTI A., VALCKX D., DECALLONNE R., BOUILLON R., MATHIEU C. (2003). The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech.*; **14**(1): 33-43.
- OZAKI A., FUKUSHIMA A., ISHIDA W., ZINCHUK O., FUKATA K., HAYASHI Y., ENZAN H., TAKATA M., YAGITA H., UENO H. (2004). Analysis of Ag-presenting cells in the conjunctiva during the development of experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis. *Curr Eye Res.*; **29**(4-5): 277-86.
- OZAKI K., LEONARD W.J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem.*; **277** (33): 29355-8.
- PACCAUD J.P., SCHIFFERLI J.A., BAGGIOLINI M. (1990). NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **166**: 187–192.
- PACIFICI R. (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*; **11**: 1043–1051.
- PAJKRT D., CAMOGLIO L., TIEL - VAN BUUL M.C.M., DE BRUIN K., CUTLER D., AFFRIME M.B., RIKKEN G., VAN DER POLL T., TEN CATE J.W., VAN DEVENTER S.J.H. (1997). Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: Effect of timing of recombinant human IL-10 administration. *J. Immunol.*; **158**: 3971–3977.
- PAKKANEN R., AALTO, J. (1997) Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *Int. Dairy Journal*; **7**: 285-297.
- PALEOLOG E.M., HUNT M., ELLIOTT M.J., FELDMANN M., MAINI R.N., WOODY J.N. (1996). Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*; **39**: 1082–1091.
- PALEOLOG E.M., YOUNG S., STARK A.C., MCCLOSKEY R.V., FELDMANN M., MAINI R.N. (1998). Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF) by TNF α and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*; **41**: 1258–1265.
- PANCRE V., JOSEPH M., CAPRON A. *et al.* (1988). Recombinant human interferon- γ induces increased IgE receptor expression on human platelets. *Eur. J. Immunol.*; **18**: 829–832.
- PAQUET P., PIERARD G. (1996). Interleukin-6 and the skin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*; **109**: 308–317.
- PARADIS M.R. (1994). Update on neonatal septicemia. *Vet Clin North Am Equine Pract.*; **10**(1): 109-35.
- PAUL W.E. (1991). IL-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*; **77**: 1859–1870.
- PECANHA L.M., SNAPPER C.M., LEES A., MOND J.J. (1992). Lymphokine control of type 2 antigen response. IL-10 inhibits IL-5- but not IL-2-induced Ig secretion by T cell-independent antigens. *J. Immunol.*; **148**: 3427–3432.

- PECANHA L.M., SNAPPER C.M., LEES A., YAMAGUCHI H., MOND J.J. (1993). IL-10 inhibits T cell-independent but not T cell-dependent responses in vitro. *J. Immunol.*; **150**: 3215–3223.
- PECK R. (1989). Interferon induces monocyte killing of *Listeria monocytogenes* by an oxygen-dependent pathway or -interferons by oxygen-independent pathways. *J. Leukoc. Biol.*; **46**: 434–440.
- PEETERS D., PETERS I.R., FARNIR F., CLERCX C., DAY M.J. (2005). Real-time RT-PCR quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in histologically normal canine nasal, bronchial and pulmonary tissue. *Vet Immun Immunopathol.*; **104**: 195-204.
- PEETERS D., PETER I.R., CLERCX C., DAY M.J. (2006). Quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in nasal biopsies from dogs with sino-nasal Aspergillosis. *Vet Microbiol.*; **114**: 318-326.
- PENNICA D., NEDWIN G.E., HAYFLICK J.F., SEEBURG P.H., PALLADINO M.A., KOHR W.J., AGGARWAL B.B., GOEDDEL D.V. (1984). Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*; **312**: 724–729.
- PEREZ L., ORTE J., BRIEVA J.A. (1995). Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor-secreting B cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10. *Arthritis Rheum.*; **38**: 1771–1776.
- PERLER L., SCHWEIZER M., JUNGI T.W., PETERHANS E. (2000). Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and -independent pathways. *J Gen Virol.*; **81(Pt 4)**: 881-887.
- PERSSON S., MIKULOWSKA A., NARULA S., O’GARRA A., HOLMDAHL R. (1996). Interleukin-10 suppresses the development of collagen type II-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats. *Scand. J. Immunol.*; **44**: 607–614.
- PESCHON J.J., SLACK J.L., REDDY P., STOCKING K.L., SUNNARBORG S.W., LEE D.C., RUSSELL W.E., CASTNER B.J., JOHNSON, R.S., FITZNER J.N., BOYCE R.W., NELSON N., KOZLOSKY C.J., WOLFSON M.F., RAUCH C.T., CERRETTI D.P., PAXTON R.J., MARCH C.J., BLACK R.A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*; **282**: 1281–1284.
- PETERHANS E., JUNGI T.W., SCHWEIZER M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals*; **31(2)**: 107-112.
- PETERS I.R., HELPS C.R., CALVERT E.L., HALL E.J., DAY M.J. (2005). Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by Real-time RT-PCR. *Vet Immun Immunopathol.*; **103**: 101-111.
- PETERS J. M., HENNUYER N., STAELS B., FRUCHART J-C., FIEVET C., GONZALES F. J., AUWERX J. (1997) Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J. Biol. Chem.*; **272**: 27307–27312.
- PEVERI P., WALZ A., DEWALD B. (1988). A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*; **167**: 1547–1559.
- PEYRON F., BURDIN N., RINGWALD P., VUILLEZ J.P., ROUSSET F., BANCHEREAU J. (1994). High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.*; **95**: 300–303.
- PFEIFFER C., STEIN J., SOUTHWOOD S., KETELAAR H., SETTE A., BOTTOMLY K. (1995). Altered Peptide Ligands Can Control CD4 T Lymphocyte Differentiation In Vivo. *J Exp Med*; **181**: 1569–74.
- PIRIE R.S., COLLIE D.D.S., DIXON P.M., MCGORUM B.C. (2003). Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clinical and Exp. Allergy.*; **33**: 676-683.
- PLUM J., DE SMEDT M., BILLIAU A., HEREMANS H. (1991). IFN- γ reverses IL-4 inhibition of fetal thymus growth in organ culture. *J. Immunol.*; **147**: 50–54.
- POPOVICH P.G., STOKES B.T., WHITACRE C.C. (1996). Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res*; **45**: 349-363.

- POTGIETER L.N. (1995). Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*; **11(3)**: 501-520.
- POVOA P., ALMEIDA E., MOREIRA P., FERNANDES A., MEALHA R., ARAGAO A., SABINO H. (1998). C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med.*; **24**: 1052-1056.
- POWELL D.G., DWYER R.M., TRAUB-DARGATZ J.L., FULKER R.H., WHALEN J.W. JR, SRINIVASAPPA J., ACREE W.M., CHU H.J. (1997). Field study of the safety, immunogenicity, and efficacy of an inactivated equine rotavirus vaccine. *J Am Vet Med Assoc.*; **211(2)**: 193-8.
- POWELL J.D., RAGHEB J.A., KITAGAWA-SAKAKIDA S., SCHWARTZ R.H. (1998). Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol. Rev.*; **165**: 287-300.
- POWELL J.D., LERNER C.G., SCHWARTZ R.H. (1999). Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J. Immunol.*; **162**: 2775-2784.
- POWERS R., GARRETT D.S., MARCH C.J, FRIEDEN E.A., GRONENBORN A.M., CLORE G.M. (1992). Three-dimensional solution structure of human IL-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science*; **256**: 1673-1677.
- POWRIE F., COFFMAN R.L. (1993a). Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. *Res. Immunol.*; **144**: 639-643.
- POWRIE F., MENON S., COFFMAN R.L. (1993b). Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.*; **23**: 3043-3049.
- POWRIE F., LEACH M.W., MAUZE S., MENON S., BARCOMB CADDLE L., COFFMAN R.L. (1994). Inhibition of TH1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*; **1**: 553-562.
- PRADIER O., WILLEMS F., ABRAMOWICZ D., SCHANDENE L., DE BOER M., THIELEMANS K., CAPEL P., GOLDMAN M. (1996). CD40 engagement induces monocyte procoagulant activity through an interleukin-10 resistant pathway. *Eur. J. Immunol.*; **26**: 3048-3054.
- PREAS H.L., REDA 2ND, D., TROPEA M., VANDIVIER R.W., BANKS S.M., AGOSTI J.M., SUFFREDINI A.F. (1996). Effects of recombinant soluble type I interleukin-1 receptor on human inflammatory responses to endotoxin. *Blood*; **88**: 2465-2472.
- PREAS H.L., NYLEN E.S., SNIDER R.H., BECKER K.L., WHITE J.C., AGOSTI J.M., SUFFREDINI A.F. (2001). Effects of anti-inflammatory agents on serum levels of calcitonin precursors during human experimental endotoxemia. *J Infect Dis.*; **184(3)**: 373-376.
- PRENDIVILLE J., THATCHER N., LIND M., MCINTOSH R., GHOSH A., STERN P., CROWTHER D. (1993). Recombinant human interleukin-4 (rhu IL-4) administered by the intravenous and subcutaneous routes in patients with advanced cancer – a phase I toxicity study and pharmacokinetic analysis. *Eur. J. Cancer*; **29**: 1700-1707.
- PRESCOTT J.F. (1991). *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev.*; **4(1)**: 20-34.
- PRIESCHL E.E., KULMBURG P.A., BAUMRUKER T. (1995). The nomenclature of chemokines. *Int Arch Allergy Immunol.*; **107 (4)**: 475-83.
- PRIESTLE J.P., SCHAR H.P., GRUTTER M.G. (1988). Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta. *EMBO J.*; **7**: 339-343.
- PUGIN J., ULEVITCH R.J., TOBIAS P.S. (1993). A critical role for monocytes and CD14 in endotoxin-induced endothelial cell activation. *J. Exp. Med.*; **178**: 2193-2200.
- PUNNONEN J., DE WAAL MALEFYT R., VAN VLASSELAER P., GAUCHAT J.F., DE VRIES J.E. (1993). IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J. Immunol.*; **151**: 1280-1289.

- PUREN A.J., FANTUZZI G., DINARELLO C.A. (1999). Gene expression, synthesis and secretion of IL-1 β and IL-1 β 8 are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mice spleen cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **96**: 2256–2261.
- PUSTERLA N., MAGDESIAN K.G., MAPES S., LEUTENEGGER C.M. (2006). Expression of molecular markers in blood of neonatal foals with sepsis. *Am J Vet Res.*; **67**(6): 1045-9.
- RABINOVITCH A., SUAREZ-PINZON W.L., SORENSON O., BLEAKLEY R.C., POWER R.F., RAJOTTE R.V. (1995). Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice. Analysis of cytokine mRNA expression in the graft. *Transplantation*; **60**: 368–374.
- RADAEV S., SUN P. (2002). Recognition of immunoglobulin by Fc γ receptors. *Molecular Immunology*; **38**: 1073-1083.
- RAFII S., SHAPIRO F., RIMARACHIN J., NACHMAN R.L., FERRIS B., WEKSLER B., MOORE M.A., ASCH A.S. (1994). Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood*; **84**: 10–19.
- RAJA S.M., METKAR S.S., FROELICH C.J. (2003). Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Current Opinion in Immunology*; **15**: 528-532.
- RAJARATHNAM K., SYKES B.D., KAY C.M. (1994). Neutrophil activation of monomeric interleukin-8. *Science*; **264**: 90–92.
- RAMANI M., KHECHAI F., OLLIVIER V., TERNISIEN C., BRIDEY F., HAKIM J., DE PROS, D. (1994). Interleukin-10 and pentoxifylline inhibit C-reactive protein-induced tissue factor gene expression in peripheral human blood monocytes. *FEBS Lett.*; 356: 86–88.
- RAMANI P., BALKWILL F.R. (1987). Enhanced metastasis of a mouse carcinoma after in vitro treatment with interferon- γ . *Int. J. Cancer*; **40**: 830–834.
- RAMPART M., DE SMET W., FIERS W., HERMAN A.G. (1989). Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin in vivo. *J. Exp. Med.*; **169**: 2227–2232.
- RAMSAY A.J., HUSBAND A.J., RAMSHAW I.A., BAO S., MATTHAEI K.I., KOEHLER G., KOPF M. (1994). The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science*; **264**: 561–563.
- RANGANATH S., OUYANG W., BHATTARCHARYA D., SHA W.C., GRUPE A., PELTZ G., MURPHY K.M. (1998). GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J. Immunol.*; **161**: 3822–3826.
- RANSOHOFF R.M., DEVAJYOTHI C., ESTES M. L. *et al.* (1991). Interferon- γ specifically inhibits interferon- γ -induced class II major histocompatibility complex gene transcription in a human astrocytoma cell line. *J. Neuroimmunol.*; **33**: 103–112.
- RAY A., PREFONTAINE K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **91**: 752–756.
- RAYNAL M.C., LIU Z.Y., HIRANO T., MAYER L., KISHIMOTO T., CHEN KIANG S. (1989). Interleukin 6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **86**: 8024–8028.
- REDDY R.C., CHEN G.H., TEKCHANDANI P.K., STANDIFORD T.J. (2001). Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse. *Immunol Res.*; **24** (3): 273-87.
- REDL H., SCHLAG G., SCHIESSER A., DAVIES J. (1995). Thrombomodulin release in baboon sepsis: its dependence on the dose of Escherichia coli and the presence of tumor necrosis factor. *J Infect Dis.*; **171**: 1522-1527.
- REDL H., SPITTLER A., STROHMAIER W. (2003). Markers of sepsis. In Vincent J., Carlet J., Opal S.M. : *The Sepsis Text*. Kluwer Academic Publishers.

- REDPATH S., ANGULO A., GASCOIGNE N.R., GHAZAL P. (1999). Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J. Immunol.*; **162**: 6701–6707.
- REED S.G., BROWNELL C.E., RUSSO D.M., SILVA J.S., GRABSTEIN K.H., MORRISSEY P.J. (1994). IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*; **153**: 3135–3140.
- REFAELI Y., VAN PARIJS L., LONDON C.A., TSCHOPP J., ABBAS A.K. (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*; **8**: 615–623.
- REINER S.L., LOCKSLEY R.M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.*; **13**: 151–177.
- REINHART K., MEISNER M., BRUNKHORST F.M. (2006). Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin.*; **22**: 503–519.
- REINHOLD U., WEHRMAN W., KUKEL S., KREYSEL H.W. (1990). Evidence that defective interferon- γ production in atopic dermatitis patients is due to intrinsic abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.*; **79**: 374–380.
- REMICK D.G. (2007). Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol.*; **170**: 1435–1444.
- REMICK D.G., BOLGOS G., COPELAND S., SIDDIQUI J. (2005). Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response in sepsis. *Infection and immunity.*; **73**: 2751–2757.
- RENAULD J.C., VINK A., VAN SNICK J. (1989). Accessory signals in murine cytolytic T cell responses. Dual requirement for IL-1 and IL-6. *J. Immunol.*; **143**: 1894–1898.
- RENNICK D., HUNTE B., HOLLAND G., THOMPSON-SNIPES L. (1995). Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood*; **85**: 57–65.
- REVEL M. (1992). Growth regulatory functions of IL6 and antitumour effects. *Res. Immunol.*; **143**: 769–773.
- REZNIKOV L., FANTUZZI G., SELZMAN C.H., SHAMES B.D., BARTON H.A., BELL H., MCGREGOR J.A., DINARELLO C.A. (1999). Utilization of endoscopic inoculation in a mice model of intrauterine infection-induced preterm birth: role of interleukin 1beta. *Biol. Reprod.*; **60**: 1231–1238.
- REZNIKOV L., SHAMES B.D., BARTON H.A., SELZMAN C.H., FANTUZZI G., KIM S.-H., JOHNSON S.M., DINARELLO C.A. (2000). Interleukin-1-deficiency results in reduced NF-kB levels in pregnant mice. *Am. J. Physiol.*; **278**: 263–270.
- RHODES S.G., COCKSEGE J.M., COLLINS R.A., MORRISON W.I. (1999). Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J Gen Virol.*; **80** (7): 1673–1679.
- RIGANO R., PROFUMO E., IOPPOLO S., NOTARGIACOMO S., TEGGI A., SIRACUSANO A. (1999). Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.*; **115**: 503–507.
- RISSOAN M.C., SOUMELIS V., KADOWAKI N., GROUARD G., BRIERE F., DE WAAL MALEFYT R., LIU Y.J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*; **283**: 1183–1186.
- RIVIERE I., SUNSHINE M.J., LITTMAN D.R. (1998). Regulation of IL-4 expression by activation of individual alleles. *Immunity*; **9**: 217–228.
- ROBB R.J., SMITH K.A. (1981). Heterogeneity of human T-cell growth factor(s) due to variable glycosylation. *Mol Immunol.*; **18**: 1087–1094.
- ROBERTSON J.M., JENSEN P.E., EVAVOLD B.D. (2000). DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal Ovalbumin 323–339 epitope. *J Immunol*; **164**: 4706–4712.
- ROBINSON N.E., DERKSEN F.J., OLSZEWSKI M.A., BUECHNER-MAXWELL V.A. (1996). The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J.*; **152**(3): 283–306.

- ROBINSON N.E., JACKSON C., JEFCOAT A., BERNEY C., PERONI D., DERKSEN F.J. (2001). Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine vet. J.*; **34**: 17-22.
- RODE H.-J., JANSSEN W., ROSEN-WOLFF A., BUGERT J.J., THEIN P., BECKER Y., DARAI G. (1993). The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin-10 (IL-10)-like gene. *Virus Genes*; **7**: 111-116.
- ROGERS H.W., SHEEHAN K.C., BRUNT L.M., DOWER S.K., UNANUE E., SCHREIBER R.D. (1992). Interleukin-1 participates in the development of anti-Listeria responses in normal and SCID mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **89**: 1011-1015.
- ROGERS P.R., HUSTON G., SWAIN S.L. (1998). High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *J. Immunol.*; **161**: 3844-3852.
- ROILIDES E., DIMITRIADOU A., KADILTSOGLU I., SEIN T., KARPOUZAS J., PIZZO P.A., WALSH T.J. (1997). IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *J. Immunol.*; **158**: 322-329.
- ROSENBERG A.S., FINBLOOM D.S., MANIERO T.G., VAN DER MEIDE P.H., SINGER A. (1990). Specific prolongation of MHC Class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN- γ monoclonal antibody. *J. Immunol.*; **144**: 4648-4650.
- ROSENBERG S.A., LOTZE M.T., MUUL L.M., CHANG A.E., AVIS F.P., LEITMAN S., LINEHAN W.M., ROBERTSON C.N., LEE R.E., RUBIN J.T. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.*; **316**: 889-897.
- ROSENWASSER L.J. (1999). Promoter polymorphism in the candidate genes, IL-4, IL-9, TGF-beta1 for atopy and asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.*; **118**: 268-270.
- ROSS J.A., NAGY Z.S., CHENG H., STEPKOWSKI S.M., KIRKEN R.A. (2007). Regulation of T cell homeostasis by JAKs and STATs. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*; **55** (4): 231-45.
- ROSSELLI F., SANCEAU J., WIETZERBIN J., MOUSTACCHI E. (1992). Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. *Hum. Genet.*; **89**: 42-48.
- ROTHER J., LESSLAUER W., LOTSCHER H., LANG Y., KOEBEL P., KONTGEN F., ALTHAGE A., ZINKERNAGEL R., STEINMETZ M., BLUETHMANN H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF α -mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*; **364**: 798-802.
- ROTHMAN P. (1993). IL-4 targeting of immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Res. Immunol.*; **144**: 579-583.
- ROTT O., FLEISCHER B., CASH E. (1994). Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur. J. Immunol.*; **24**: 1434-1440.
- ROULEAU M., COTTREZ F., BIGLER M., ANTONENKO S., CARBALLIDO J.M., ZLOTNIK A., RONCAROLO M.G., GROUX H. (1999). IL-10 transgenic mice present a defect in T cell development reminiscent of SCID patients. *J. Immunol.*; **163**: 1420-1427.
- ROUSSET F., ROBERT J., ANDARY M. *et al.* (1991). Shifts in interleukin-4 and interferon- γ production by T cells of patients with elevated IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*; **87**: 58-69.
- ROUSSET F., GARCIA E., DEFRANCE T., PERONNE C., HSU D.-H., KASTELEIN R., MOORE K.W., BANCHEREAU J. (1992). IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **89**: 1890-1893.
- ROUSSET F., PEYROL S., GARCIA E., VEZZIO N., ANDUJAR M., GRIMAUD J.A., BANCHEREAU J. (1995). Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int. Immunol.*; **7**: 1243-1253.

- ROWBOTTOM A.W., LEPPER M.W., GARLAND R.J., COX C.V., CORLEY E.G., OAKHILL A., STEWARD C.G. (1999). Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology*; **98**: 80–89.
- ROY M., WALDSCHMIDT T., ARUFFO A., LEDBETTER J., NOELLE R.J. (1993). The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal cloned CD4+ cells. *J. Immunol.*; **151**: 2497.
- RUBARTELLI A., COZZOLINO F., TALIO M., SITIA R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.*; **9**: 1503–1510.
- RUBIN J.T., LOTZE M.T. (1992). Acute gastric mucosal injury associated with the systemic administration of interleukin-4. *Surgery*; **111**: 274–280.
- RUEF C., BUDDE K., LACY J., NORTHEMANN W., BAUMANN M., STERZEL R.B., COLEMAN D.L. (1990). Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int.*; **38**: 249–257.
- RUNGCUN Y., MAES H., CORSI M., DELLNER F., WEN T., KIESSLING R. (1998). Interferon impairs the ability of monocyte-derived dendritic cells to present tumour-specific antigens and reduces their expression of CD1A, CD80 and CD4. *Cytokine*; **10**: 747–755.
- RUSCHEN S., LEMM G., WARNATZ H. (1989). Spontaneous and LPS stimulated production of intracellular IL-1 β by synovial fluid macrophages in rheumatoid arthritis is inhibited by IFN- γ . *Clin. Exp. Immunol.*; **76**: 246.
- RUSH B., RAUB E.S., RHOADS W.S. (1998). Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res*; **59**: 1039-1043.
- SADLACK B., MERZ H., SCHORLE H., SCHIMPL A., FELLER A.C., HORAK I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*; **75**: 253–261.
- SADLACK B., LOHLER J., SCHORLE H., KLEBB G., HABER H., SICKEL E., NOELLE R.J., HORAK I. (1995). Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.*; **25**: 3053–3059.
- SAELAND S., DUVERT V., MOREAU I., BANCHEREAU J. (1993). Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 Ligation. *J. Exp. Med.*; **178**: 113–120.
- SAITO I., HARUTA K., SHIMUTA M., INOUE H., SAKURAI H., YAMADA K., ISHIMARU N., HIGASHIYAMA H., SUMIDA T., ISHIDA H., SUDA T., NODA T., HAYASHI Y., TSUBOTA K. (1999). Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J. Immunol.*; **162**: 2488–2494.
- SALEEM, S., KONIECZNY, B.T., LOWRY, S.F., BADDOURA, F.K., LAKKIS, F.G. (1996). Acute rejection of vascularized heart allografts in the absence of IFN γ . *Transplantation*; **62**: 1908–1996.
- SALEH M., WIEGMANS A., MALONE Q., STYLLI S.S., KAYE A.H. (1999). Effect of in situ retroviral interleukin4 transfer on established intracranial tumors. *J. Natl Cancer Inst.*; **91**: 438–445.
- SALVEMINI D., WANG Z. Q., BOURDON D. M., STERN M. K., CURRIE M. G., MANNING P. T. (1996) Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur. J. Pharmacol.*; **303**: 217–220.
- SALVEMINI D., MAZZON E., DUGO L., RILEY D. P., SERRAINO I., CAPUTI A. P., CUZZOCREA S. (2001) Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. *Br. J. Pharmacol.*; **132**: 815–827.
- SANKARAN D., ASDERAKIS A., ASHRAF S., ROBERTS I.S., SHORT C.D., DYER P.A., SINNOTT P.J., HUTCHINSON I.V. (1999). Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int.*; **56**: 281–288.

- SARRIS A.H., BROXMEYER H.E., WIRTHMUELLER U. *et al.* (1993). Human interferon-inducible protein 10: Expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.*; **178**: 1127–1132.
- SAVINO R., LAHM A., GIORGIO M., CABIBBO A., TRAMONTANO A., CILIBERTO G. (1993). Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor-binding site: implications for its three-dimensional structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **90**: 4067–4071.
- SCHARTON T.M., SCOTT P. (1993). Natural killer cells are a source of interferon that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.*; **178**: 567–577.
- SCHARTON T.M., WYNN T.A., DENKERS E. Y. *et al.* (1996). In the absence of endogenous IFN- γ , mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J. Immunol.*; **157**: 4045–4054.
- SCHARTON-KERSTEN T., NAKAJIMA H., YAP G., SHER A., LEONARD W.J. (1998). Infection of mice lacking the common cytokine receptor-chain (c) reveals an unexpected role for CD4+ T lymphocytes in early IFN- γ -dependent resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*; **160**: 2565–2569.
- SCHINDLER R., CLARK B.D., DINARELLO C.A. (1990a). Dissociation between interleukin-1 mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.*; **265**: 10232–10237.
- SCHINDLER R., GHEZZI P., DINARELLO C.A. (1990b). IL-1 β induces IL-1 β . IFN- γ suppresses IL-1 β but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1 β . *J. Immunol.*; **144**: 2216–2222.
- SCHINDLER R., GELFAND J.A., DINARELLO C.A. (1990c). Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of IL-1 β and TNF α ; cytokine synthesis induced by LPS, IL-1 β or PMA. *Blood*; **76**: 1631–1638.
- SCHIRÀ R., LONGONI D., ROSSI V., MAGLIA O., DONI A., ARSURA M., CARRARA G., MASERA G., VANNIER E., DINARELLO C.A., RAMBALDI A., BIONDI A. (1993). Suppression of juvenile chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 receptor antagonist. *Blood*; **83**: 460–465.
- SCHMITTGEN T.D., ZAKRAJSEK B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*; **46(1-2)**: 69-81.
- SCHOLS D., DE CLERCQ E. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production. *J. Virol.*; **70**: 4953–4960.
- SCHORLE H., HOLTSCHKE T., HUNIG T., SCHIMPL A., HORAK I. (1991). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*; **352**: 621–624.
- SCHRODER J.M. (1989). The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J. Exp. Med.*; **170**: 847–863.
- SCHRODER J.M., CHRISTOPHERS E. (1986). Identification of C5ades arg and an anionic neutrophil-activating peptide (ANAP) in psoriatic scales. *J. Invest. Dermatol.*; **87**: 53–58.
- SCHWARZ A., GRABBE S., RIEMANN H., ARAGANE Y., SIMON M., MANON S., ANDRADE S., LUGER T.A., ZLOTNIK A., SCHWARZ T. (1994). In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.*; **103**: 211–216.
- SCHWEIZER M., PETERHANS E. (2001). Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol.*; **75(10)**: 4692-4698.
- SCOTT P. (1991). IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*; **147**: 3149–3155.
- SCUMPIA P.O., MOLDAWER L.L. (2005). Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med.*; **33**: 468-471.

- SEDER R.A., AHMED R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature Immunology*; **4**: 835-842.
- SEHGAL P.B. (1992). Regulation of IL6 gene expression. *Res. Immunol.*; **143**: 724-734.
- SEHGAL P.B., WALTHER Z., TAMM I. (1987). Rapid enhancement of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **84**: 3663-3667.
- SEHGAL P.B., HELFGOTT D.C., SANTHANAM U., TATTER S.B., CLARICK R.H., GHRAYEB J., MAY L.T. (1988). Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J. Exp. Med.*; **167**: 1951-1956.
- SEKIDO N., MUKAIDA N., HARADA A. (1993). Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*; **365**: 654-657.
- SELA O., EL ROEIY A., ISENBERG D.A., KENNEDY R.C., COLACO C.B., PINKHAS J., SHOENFELD Y. (1987). A common anti-DNA idiotype in sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *Arthritis Rheum.*; **30**: 50-56.
- SELBERG O., HECKER H., MARTIN M., KLOS A., BAUTSCH W., KOHL J. (2000). Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a and interleukin-6. *Crit Care Med.*; **28**: 2793-2798.
- SENTSUI H., TAKAMI R., NISHIMORI T., MURAKAMI K., YOKOYAMA T., YOKOMIZO Y. (1998) Anti-Viral effect of Interferon- α on Bovine viral Diarrhea Virus *J. Vet. Med. Sci.*; **60** (12): 1329-1333.
- SERKKOLA E., HURME M. (1993). Synergism between protein-kinase C and cAMP-dependent pathways in the expression of the interleukin-1 gene is mediated via the activator-protein-1 (AP-1) enhancer activity. *Eur. J. Biochem.*; **213**: 243-249.
- SHANLEY T.P., SCHMAL H., FRIEDL H.P., JONES M.L., WARD P.A. (1995). Regulatory effects of intrinsic IL-10 in IgG immune complex-induced lung injury. *J. Immunol.*; **154**: 3454-3460.
- SHAPIRO L., PANAYOTATOS N., MEYDANI S.N., WU D., DINARELLO C.A. (1994). Ciliary neurotrophic factor combined with soluble receptor inhibits synthesis of pro-inflammatory cytokines and prostaglandin-E2 in vitro. *Exp. Cell Res.*; **215**: 51-56.
- SHARMA K., WANG R. X., ZHANG L. Y., YIN D. L., LUO X. Y., SOLOMON J. C., JIANG R. F., MARKOS K., DAVIDSON W., SCOTT D. W., SHI Y. F. (2000) Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol. Ther.*; **88**: 333-347.
- SHAW J.P., UTZ P.J., DURAND D.B., TOOLE J.J., EMMAL E.A., CRABTREE G.R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation. *Science*; **241**: 202-205.
- SHENKIN A., FRASER W.D., SERIES J., WINSTANLEY F.P., MCCARTNEY A.C., BURNS H.J., VAN DAMME J. (1989). The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res.*; **8**: 123-127.
- SHER A., FIORENTINO D., CASPAR P., PEARCE E., MOSMANN T. (1991). Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of TH1 cytokine synthesis in helminth infection. *J. Immunol.*; **147**: 2713-2716.
- SHER T., YI H. F., MCBRIDE O. W., GONZALEZ F. J. (1993) cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*; **32**: 5598 - 5604.
- SHERRY B., GELIN J., FONG Y. *et al.* (1989). Anticachectin/tumor necrosis factor- α antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. *FASEB J.*; **3**: 1956-1962.

- SHERWOOD E.R., PROUGH D.S. (2000). Interleukin-8, neuroinflammation, and secondary brain injury. *Crit Care Med.*; **28**(4): 1221-3.
- SHERWOOD E.R., TOLIVER-KINSKY T. (2004). Mechanism of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*; **18**: 385-405.
- SHIOHARA M., KOIKE K., NAKAHATA T. (1993). Synergism of interferon- γ and stem cell factor on the development of murine hematopoietic progenitors in serum-free culture. *Blood*; **81**: 1435-1441.
- SHOENFELD Y., ISENBERG D.A. (1988). Mycobacteria and autoimmunity [published erratum appears in *Immunol. Today* 1988 Sep; 9(9): 77]. *Immunol. Today*; **9**: 178-182.
- SICA A., TAN T.H., RICE N., KRETZSCHMAR M., GHOSH P., YOUNG H.A. (1992). The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-B binds to the intronic region of the human interferon- γ gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **89**: 1740-1744.
- SICA A., DORMAN L., VIGGIANO V. *et al.* (1997). Interaction of NF-B and NFAT with the interferon- γ promoter. *J. Biol. Chem.*; **272**: 30412-30420.
- SIEGEL S.A., SHEALY D.J., NAKADA M.T., LE J., WOULFE D.S., PROBERT L., KOLLIAS G., GHRAYEB J., VILCHEK J., DADDONA P.E. (1995). The mice/human chimeric monoclonal cA2 neutralizes TNF α in vitro and protects transgenic topifrom cachexia and TNF α lethality in vivo. *Cytokine*; **7**: 15-25.
- SIELING P.A., ABRAMS J.S., YAMAMURA M., SALGAME P., BLOOM B.R., REA T.H., MODLIN R.L. (1993). Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J. Immunol.*; **150**: 5501-5510.
- SIELING P.A., MODLIN R.L. (1995) in *Interleukin-10* (ed. J. E. de Vries and R. de Waal Malefyt), IL-10 in mycobacterial infection 79-87 R.G. Landes Company, Austin, TX.
- SILEGHEM M., HAMERS R., DE BAETSELIER P. (1987). Experimental Trypanosoma brucei infections selectively suppress both interleukin 2 production and interleukin 2 receptor expression. *Eur. J. Immunol.*; **17**: 1417-1421.
- SIMONET W.S., HUGHES T.M., NGUYEN H.Q., TREBASKY L.D., DANILENKO D.M., MEDLOCK E.S. (1994). Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8. *J. Clin. Invest.*; **94**: 1310-1319.
- SIMPSON R.J., HAMMACHER A., SMITH D.K., MATTHEWS M.J., WARD D.L. (1997). Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.*; **6**: 929-955.
- SIRKO S., SCHINDLER R., DOYLE M.J., WEISMAN S.M., DINARELLO C.A. (1991). Transcription, translation and secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor: effects of tebufelone, a dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor. *Eur. J. Immunol.*; **21**: 242-250.
- SMELAND E.B., BLOMHOFF H.K., FUNDERUD S., SHALABY M.R., ESPEVIK T. (1989). Interleukin 4 induces selective production of interleukin 6 from normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med.*; **170**: 1463-1468.
- SMITH J.W., URBA W.J., CURTI B.D., ELWOOD L.J., STEIS R.G., JANIK J.E., SHARFMAN W.H., MILLER L.L., FENTON R.G., CONLON K.C., ROSSIO J., KOPP W., SHIMUZUT M., OPPENHEIM J.J., LONGO D. (1992). The toxic and hematologic effects of interleukin-1 alpha administered in a phase I trial to patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.*; **10**, 1141-1152.
- SMITH J.W., LONGO D., ALFORD W.G., JANIK J.E., SHARFMAN W.H., GAUSE B.L., CURTI B.D., CREEKMORE S.P., HOLMLUND J.T., FENTON R.G., SZNOL M., MILLER L.L., SHIMZU M., OPPENHEIM J.J., FIEM S.J., HURSEY J.C., POWERS G.C., URBA W.J. (1993). The effects of treatment with interleukin-1 on platelet recovery after high-dose carboplatin. *N. Engl. J. Med.*; **328**: 756-761.
- SMITH K.A. (1980). T-cell growth factor. *Immunol. Rev.*; **51**: 337-357.
- SMITH K.A. (1989). The interleukin 2 receptor. *Annu. Rev. Cell. Biol.*; **5**: 397-425.

- SMITH K.A., CRABTREE G.R., KENNEDY S.J., MUNCK A.U. (1977). Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Nature*; **267**: 523–526.
- SNAPPER C.M., PESCHEL C., PAUL W.E. (1993). IFN- γ stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*; **140**: 2121–2127.
- SNIJDEWINT F.G. M., KALINSKI P., WIERENGA E.A., BOS J.D., KAPSENBERG M.L. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J. Immunol.*; **150**: 5321–5329.
- SOBIN L.H. (2001). TNM: principles, history and relation to other prognostic factors. *Cancer*; **91(Suppl.8)**: 1589-1592.
- SOMERS W., STAHL M., SEEHRA S.J. (1997). 1.9A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.*; **16**: 989–997.
- SONG M., KELLUM J.A. (2005). Interleukin-6. *Crit Care Med.*; **33**: 463-465.
- SONG Z., CASOLARO V., CHEN R., GEORAS S.N., MONOS S., ONO S.J. (1996). Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J. Immunol.*; **156**: 424–429.
- SONNE C., FONFARA S., DIETZ R., KIRKEGAARD M., LETCHER R.J., SHAHMIRI S., ANDERSEN S., MOLLER P. (2007). Multiple cytokine and acute-phase protein gene transcription in West Greenland dogs (*Canis familiaris*) dietary exposed to organic environmental pollutants. *Arch Environ Contam Toxicol.*; **53**: 110-118.
- SONODA Y., MUKAIDA N., WANG J.B., SHIMADA-HIRATSUKA M., NAITO M., KASAHARA T., HARADA A., INOUE M., MATSUSHIMA K. (1998). Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine (S). *J. Immunol.*; **160**: 6159–6165.
- SOZZANI S., GHEZZI S., IANNOLO G., LUINI W., BORSATTI A., POLENTARUTTI N., SICA A., LOCATI M., MACKAY C., WELLS T.N., BISWAS P., VICENZI E., POLI G., MANTOVANI A. (1998). Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J. Exp. Med.*; **187**: 439–444.
- SPANGELO B.L., JUDD A.M., ISAKSON P.C., MACLEOD R.M. (1989). Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology*; **125**: 575–577.
- SPENCER N. F., POYNTER M. E., IM S. Y., DAYNES R. A. (1997) Constitutive activation of NF- κ B in an animal model of aging. *Int. Immunol.*; **9**: 1581–1588.
- SPITTLER A., SCHILLER C., WILLHEIM M., TEMPFER C., WINKLER S., BOLTZ-NITULESCU G. (1995). IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology*; **85**: 311–317.
- SPOONER C.E., MARKOVITZ N.P., SARAVOLATZ L.D. (1992). The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clin Immunol Immunopathol.*; **62**: 11-17.
- SPRANG S., BAZAN J. (1993). *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **3**: 815–827.
- SPRANG S.R., BAZAN J.F. (1993). Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **3**: 815–827.
- SRIBNICK A., WINGRAVE J.M., MATZELLE D.D., WILFORD G.G., RAY S.K., BANIK N.L. (2005). Estrogen attenuated markers of inflammation and decreased lesion volume in acute spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res*; **82**: 283-293.
- SRIBNICK E.A., WINGRAVE J.M., MATZELLE D.D., RAY S.K., BANIK N.L.: (2003). Estrogen as a neuroprotective agent in the treatment of spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*; **993**: 125-133.

- STAELS B., KOENIG W., HABIB A., MERVAL R., LEBRET M., TORRA I. P., DELERIVE P., FADEL A., CHINETTI G., FRUCHART J. C., NAJIB J., MACLOUF J., TEDGUI A. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR α activators. *Nature*; **393**: 790–793.
- STANDIFORD T.J., STRIETER R.M., LUKACS N.W., KUNKEL S.L. (1995). Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*; **155**: 2222–2229.
- STANTON G.J., JORDAN C., HART A., HEARD H., LANGFORD M.P., BARON S. (1995). Nondetectable levels of interferon γ is a critical host defense during the first day of herpes simplex virus infection. *Microb. Pathogen.*; **3**: 179–183.
- STARK G.R., KERR I.M., WILLIAMS B.R. G., SILVERMAN R.H., SCHREIBER R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.*; **67**: 227–264.
- STARUCH M.J., WOOD D.D. (1983). The adjuvanticity of interleukin 1 in vivo. *J. Immunol.*; **130**: 2191–2194.
- STEINBRINK K., WOLFL M., JONULEIT H., KNOP J., ENK A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.*; **159**: 4772–4780.
- STEVENSON F.T., TORRANO F., LOCKSLEY R.M., LOVETT D.H. (1992). Interleukin-1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J. Cell. Physiol.*; **152**: 223–231.
- STOECKLE M.Y., GUAN L. (1993). High-resolution analysis of gro- mRNA poly (A) shortening: regulation by interleukin-1. *Nucleic Acids Res.*; **21**: 1613–1617.
- STONEHAM S.J., PALMER L., CASH R., ROSSDALE P.D. (2001). Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Vet J.*; **33**(6): 599-603.
- STRUTZ F., HELLER G., KRASEMANN K., KRONE B., MULLER G.A. (1999). Relationship of antibodies to endotoxin core to mortality in medical patients with sepsis syndrome. *Intensive Care Med.*; **25**: 435-444.
- STAATS H.F., ENNIS F.A. JR (1999). IL-1 β is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadministered with protein immunogens. *J. Immunol.*; **162**: 6141–6147.
- SUBERVILLE S., BELLOCQ A., FOUQUERAY B., PHILIPPE C., LANTZ O., PEREZ J., BAUD L. (1996). Regulation of interleukin-10 production by beta-adrenergic agonists. *Eur J Immunol.*; **26**: 2601–2605.
- SUEMATSU S., MATSUDA T., AOZASA K., AKIRA S., NAKANO N., OHNO S., MIYAZAKI J., YAMAMURA K., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1989). IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **86**: 7547–7551.
- SUFFYS P., BEYAERT R., VAN ROY F., FIERS W. (1988). Involvement of a serine protease in tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*; **178**: 257–265.
- SUGIYAMA E., KURODA A., TAKI H., IKEMOTO M., HORI T., YAMASHITA N., MARUYAMA M., KOBAYASHI M. (1995). Interleukin 10 cooperates with interleukin 4 to suppress inflammatory cytokine production by freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells. *J. Rheumatol.*; **22**: 2020–2026.
- SUNDAR S., SINGH V.P., SHARMA S., MAKHARIA M.K., MURRAY H.W. (1997). Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*; **176**: 1117–1119.
- SUNDSTEDT A., HOIDEN I., ROSENDAHL A., KALLAND T., VAN ROOIJEN N., DOHLSTEN M. (1997). Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J. Immunol.*; **158**: 180–186.
- SUZUKI T., TAHARA H., NARULA S., MOORE K.W., ROBBINS P.D., LOTZE M.T. (1995). Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J. Exp. Med.*; **182**: 477–486.

- SWAIN S.L. (1994). Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity*; **1**: 543–552.
- SWIHART K., FRUTH U., MESSMER N. *et al.* (1995). Mice from a genetically resistant background lacking the interferon receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response. *J. Exp. Med.*; **181**: 961–971.
- SYMONS J.A., WONG W.L., PALLADINO M. A. (1992). Interleukin 8 in rheumatoid and osteoarthritis. *Scand. J. Rheumatol.*; **21**: 92–94.
- SZABO S.J., GLIMCHER L.H., HO I.C. (1997). Genes that regulate IL-4 expression in T cells. *Curr. Opin. Immunol.*; **9**: 776–781.
- SZABO C., VIRAG L., CUZZOCREA S., SCOTT G.S., HAKE P., O'CONNOR M.P., ZINGARELLI B., SALZMAN A., KUN E. (1998). Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95**: 3867–3872.
- TAGA K., TOSATO G. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J. Immunol.*; **148**: 1143–1148.
- TAGAWA Y., SEKIKAWA K., IWAKURA Y. (1997). Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN- γ ^{-/-} mice, but not in TNF- α ^{-/-} mice. *J. Immunol.*; **159**: 1418–1428.
- TAKAI Y., WONG G.G., CLARK S.C., BURAKOFF S.J., HERRMANN S.H. (1988). B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*; **140**: 508–512.
- TAKAI Y., SEKI N., SENOH H., YOKOTA T., LEE F., HAMAOKA T., FUJIWARA H. (1989). Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis. Rheum.*; **32**: 594–600.
- TAKANASKI S., NONAKA R., XING Z., O'BYRNE P., DOLOVICH J., JORDANA M. (1994). Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J. Exp. Med.*; **180**: 711–715.
- TAKANO H., NAGAI T., ASAKAWA M., TOYOZAKI T., OKA T., KOMURO I., SAITO T., MASUDA Y. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.*; **87**: 596–602.
- TAMATANI M., CHE Y.H., MATSUZAKI H., OGAWA S., OKADO H., MIYAKE S., MIZUNO T., TOHYAMA M. (1999). Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*; **274**: 8531–8538.
- TANABE O., AKIRA S., KAMIYA T., WONG G.G., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1988). Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J. Immunol.*; **141**: 3875–3881.
- TANAKA Y., SAITO K., SHIRAKAWA F., OTA T., SUZUKI H., ETO S., YAMASHITA U. (1988). Production of B cell-stimulatory factors by B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*; **141**: 3043–3049.
- TANAKA Y., OTSUKA T., HOTOKEBUCHI T., MIYAHARA H., NAKASHIMA H., KUGA S., NEMOTO Y., NIRO H., NIHO Y. (1996). Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm. Res.*; **45**: 283–288.
- TANG B., MATSUDA T., AKIRA S., NAGATA N., IKEHARA S., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1991). Age-associated increase in interleukin 6 in MRL/lpr mice. *Int. Immunol.*; **3**: 273–278.
- TANIGUCHI T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*; **268 (5208)**: 251–5.
- TARLETON R.L. (1991). Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*; **73 (1)**: 106–9.

- TAUB D.D., LLOYD A.R., CONLON K. *et al.* (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.*; **177**: 1809.
- TE VELDE A.A., DE WAAL MALEFYT R., HUIJBENS R.J.F., DE VRIES J.E., FIGDOR C.G. (1992). IL-10 stimulates monocyte FcR surface expression and cytotoxic activity: distinct regulation of ADCC by IFN, IL-4, and IL-10. *J. Immunol.*; **149**: 4048–4052.
- TEICHMANN U., LIEBLER-TENORIO E.M., POHLENZ J.F.(2000). Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res.*; **61** (2): 174-182.
- TEMANN U.A., PRASAD B., GALLUP M.W., BASBAUM C., HO S.B., FLAVELL R.A., RANKIN J.A. (1997). A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; **16**: 471–478.
- TEPPER R.I. (1994). The anti-tumor and proinflammatory actions of IL-4. *Res. Immunol.*; **144**: 633–637.
- TERANISHI T., HIRANO T., ARIMA N., ONOUE K. (1982). Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell replacing factor (TRF)-like factor(s). *J. Immunol.*; **128**: 1903–1908.
- TERKELTAUB R., ZACHARIAE C., SANTORO D. (1991). Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum.*; **34**: 894–903.
- TERUI Y., IKEDA M., TOMIZUKA H., (1998). Activated endothelial cells induce apoptosis in leukemic cells by endothelial interleukin-8. *Blood*; **92**: 2672–2680.
- TEWARI A., BUHLES JR W. C., STARNES JR H. F. (1990). Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet*; **336**: 712–714.
- TEWARI M., QUAN L.T., O'ROURKE K., DESNOYERS S., ZENG Z., BEIDLER D.R., POIRIER G.G., SALVESEN G.S., DIXIT V.M. (1995). Yama/CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell*; **81**: 801–809.
- THAPA B.R. (2005). Therapeutic potentials of bovine colostrums. *Indian J Pediatr.*; **72**: 849-852.
- THIVIERGE M., PARENT J.L., STANKOVA J., ROLA-PLESZCZYNSKI M. (1999). Modulation of formyl peptide receptor expression by IL-10 in human monocytes and neutrophils. *J. Immunol.*; **162**: 3590–3595.
- THORBECKE G.J., SHAH R., LEU C.H., KURUVILLA A.P., HARDISON A.M., PALLADINO M.A. (1992). Involvement of endogenous tumour necrosis factor and transforming growth factor during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **89**: 7375–7379.
- TIBERGHEN P., LAITHIER V., MABED M., RACADOT E., REYNOLDS C.W., ANGININ R., LOUMI R., PAVY J.J., CAHN J.Y., NOIR A., HERVE P. (1993). Interleukin-1 administration before lethal irradiation and allogeneic bone marrow transplantation: early transient increase of peripheral granulocytes and successful engraftment with accelerated leukocyte, erythrocyte, and platelet recovery. *Blood*; **81**: 1933–1939.
- TIGGES M.A., CASEY L.S., KOSHLAND M.E. (1989). Mechanism of interleukin-2 signaling: mediation of different outcomes by a single receptor and transduction pathway. *Science*; **243**: 781–786.
- TILG H., TREHU E., SHAPIRO L., PAPE D., ATKINS M.B., DINARELLO C.A., MIER J.W. (1994). Induction of circulating soluble tumour necrosis factor receptor and interleukin 1 receptor antagonist following interleukin-1 infusion in humans. *Cytokine*; **6**: 215–219.
- TIZARD I.R. (2004). *Veterinary Immunology: an introduction*. 7th edition, Elsevier (USA).
- TOGAWA J., NAGASE H., TANAKA K., INAMORI M., UMEZAWA T., NAKAJIMA A., NAITO M., SATO S., SAITO T., SEKIYAMA H. (2002). Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*; **283**(1): 187-95.

- TOHYAMA N., KARASUYAMA H., TADA T. (1990). Growth autonomy and tumorigenicity of interleukin 6-dependent B cells transfected with interleukin 6 cDNA. *J. Exp. Med.*; **171**: 389–400.
- TOMITA M., WAKABAYASHI H., YAMAUCHI K., TERAGUCHI S., HAYASAWA H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol.*; **80**(1): 109-12.
- TOMLINSON A., APPLETON I., MOORE A. R., GILROY D. W., WILLIS D., MITCHELL J. A., WILLOUGHBY D. A. (1994) Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br. J. Pharmacol.*; **113**: 693–698.
- TONAI T., TAKETANI Y., UEDA N., NISHISHO T., OHMOTO Y., SAKATA Y., MURAGUCHI M., WADA K., YAMAMOTO S. (1999). Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*; **72**: 302-309.
- TORCIA M., LUCIBELLO M., VANNIER E., FABIANI S., MILIANI A., GUIDI G., SPADA O., DOWER S.K., SIMS J.E., SHAW A.R., DINARELLO C.A., GARACI E., COZZOLINO F. (1996). Modulation of osteoclast-activating factor activity of multiple myeloma bone marrow cells by different interleukin-1 inhibitors. *Exp. Hematol.*; **24**: 868–874.
- TORRES B.A., KAMINSKY S., PERRIN G.Q., HOBEIKA A.C., JOHNSON H.M., (2001). Superantigens: the good, the bad, the ugly . *Esp. Biol. Med.*; **226**: 164-176.
- TOSATO G., MILLER J., MARTI G., PIKE S.E. (1990). Accessory function of interleukin-1 and interleukin-6: preferential costimulation of T4 positive lymphocytes. *Blood*; **75**: 922–930.
- TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F., CERAMI A. (1987). Anti-cachectin/TNF α monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*; **330**: 662–664.
- TRACEY K.J., WEI H., MANOGUE K. R. *et al.* (1988). Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J. Exp. Med.*; **167**: 1211–1227.
- TRENT J.M., OLSON S., LAWN R.M. (1982). Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **79**: 7809–7813.
- TRINCHIERI G. (1993). Interleukin 12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol. Today*; **14**: 335–338.
- TRINCHIERI G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*; **13**: 251–276.
- TRIPP C.S., WOLF S.F., UNANUE E.R. (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **90**: 3725–3729.
- TSAN M.F., LEE C.Y., WHITE J.E. (1991). Interleukin-1 protects rats against oxygen toxicity. *J. Appl. Physiol.*; **71**: 688–697.
- TURK J., MILLER M., BROWN T., FALES W., FISHER J., GOSSER H., NELSON S., SHAW D., SOLORZANO R. (1990). Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvoviral enteritis: 88 cases (1987–1988). *J Am Vet Med Assoc.*; **196**: 771-773.
- TWARDZIK D.R., MIKOVITS J.A., RANCHALIS J.E., PURCHIO A.F., ELLINGSWAORTH L., RUSCETTI F.W. (1990). Interferon-induced activation of latent transforming growth-factor by human monocytes. *Ann. NY Acad. Sci.*; **593**: 276–284.
- UDAGAWA N., TAKAHASHI N., KATAGIRI T., TAMURA T., WADA S., FINDLAY D.M., MARTIN T.J., HIROTA H., TAGA T., KISHIMOTO T., SUDA T. (1995). Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J. Exp. Med.*; **182**: 1461–1468.

- UEJIMA Y., TAKAHASHI K., KOMORIYA K., KUROZUMI S., OCHS H.D. (1996). Effect of interleukin-10 on anti-CD40- and interleukin-4-induced immunoglobulin E production by human lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.*; **110**: 225–232.
- UEMATSU S., AKIRA S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med.*; **84**: 712–725.
- UPTON C., MOSMANN T.R., MCFADDEN G. (1995). Encoding of a homolog of the IFN- γ receptor by myxoma virus. *Science*; **258**: 1369–1372.
- UYSAL K.T., WIESBROCK S.M., MARINO M.W., HOTAMISLIGIL G.S. (1997). Protection from obesity induced insulin resistance in mice lacking TNF α -alpha function. *Nature*; **389**: 610–614.
- UYTTENHOVE C., COULIE P.G., VAN SNICK J. (1988). T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. *J. Exp. Med.*; **167**: 1417–1427.
- UZONNA J.E., KAUSHIK R.S., GORDON J.R., TABEL H. (1998). Experimental murine Trypanosoma congolense infections. Administration of anti-IFN- γ antibodies alters trypanosome-susceptible mice to a resistant-like phenotype. *J. Immunol.*; **161**: 5507–5515.
- VAN DAMME J., CAYPHAS S., OPDENAKKER G., BILLIAU A., VAN SNICK J. (1987a). Interleukin 1 and poly(rI).poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *Eur. J. Immunol.*; **17**: 1–7.
- VAN DAMME J., OPDENAKKER G., SIMPSON R.J., RUBIRA M.R., CAYPHAS S., VINK A., BILLIAU A., VAN SNICK J. (1987b). Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*; **165**: 914–919.
- VAN DAMME J., SCHAAFSMA M.R., FIBBE W.E., FALKENBURG J.H., OPDENAKKER G., BILLIAU A. (1989). Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur. J. Immunol.*; **19**: 163–168.
- VAN DEN BERG W.B. (1998). Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. *Springer Semin. Immunopathol.*; **20**: 149–164.
- VAN DER MEER J.W. M., BARZA M., WOLFF S.M., DINARELLO C.A. (1988). A low dose of recombinant interleukin 1 protects granulocytopenic mice from lethal gram-negative infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **85**: 1620–1623.
- VAN DER POLL T., BUELLER H.R., TEN CATE H., WORTEL C.H., BAUER, K.A. VAN DEVENTER S.J. H., HACK C.E., SAUERWEIN H.P., ROSENBERG R.D., TEN CATE J.W. (1990). Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N. Engl J. Med.*; **322**: 1622–1627.
- VAN DER POLL T., JANSEN J., LEVI M., TEN CATE H., TEN CATE J.W., VAN DEVENTER S.J. (1994). Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J. Exp. Med.*; **180**: 1985–1988.
- VAN DER POLL T., COYLE S.M., BARBOSA K., BRAXTON C.C., LOWRY S.F. (1996a). Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J. Clin. Invest.*; **97**: 713–719.
- VAN DER POLL T., MARCHANT A., KEOGH C.V., GOLDMAN M., LOWRY S.F. (1996b). Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.*; **174**: 994–1000.
- VAN DER POLL T., VAN DEVENTER S.J.H. (1999). Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infectious disease clinics of North America*; **13**: 413–426.
- VAN FURTH A.M., SEIJMONSBERGEN E.M., LANGERMANS J.A., GROENEVELD P.H., DE BEL C.E., VAN FURTH R. (1995). High levels of interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during the onset of bacterial meningitis. *Clin. Infect. Dis.*; **21**: 220–222.

- VAN OSTADE X., TAVERNIER J., FIERS W. (1994a). Structure-activity studies of human tumour necrosis factors. *Protein Eng.*; **7**: 5–22.
- VAN ROON J.A., VAN ROY J.L., GMELIG-MEYLING F.H., LAFEBER F.P., BIJLSMA J.W. (1996). Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum.*; **39**: 829–835.
- VAN SNICK J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.*; **8**: 253–278.
- VAN SNICK J., VINK A., CAYPHAS S., UYTENHOVE C. (1987). Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas. *J. Exp. Med.*; **165**: 641–649.
- VAN SNICK J., CAYPHAS S., SZIKORA J.P., RENAULD J.C., VAN ROOST E., BOON T., SIMPSON R.J. (1988). cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur. J. Immunol.*; **18**: 193–197.
- VAN ZEE K.J., STACKPOLE S.A., MONTEGUT W.J., ROGY M.A., CALVANO S.E., HSU K.C., CHAO M., MESCHTER C.L., LOETSCHER H., STUBER D., ETTLIN U., WIPF B., LESSLAUER W., LOWRY S.F., MOLDAWER L.L. (1994). A human tumor necrosis factor (TNF α) alpha mutant that binds exclusively to the p55 TNF α receptor produces toxicity in the baboon. *J. Exp. Med.*; **179**: 1185–1191.
- VANEGAS H., SCHAIBLE H.G. (2001). Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Prog Neurobiol.*; **64**: 327–363.
- VANNIER E., LEFORT J., BACHELET M., LELLOUCH-TUBIANA A., TERLAIN B., VARGAFTIG B.B. (1989). Lipopolysaccharide from *E. coli* modulates anaphylactic bronchoconstriction of actively sensitized guinea pigs. *Am. J. Respir. Dis.*; **139**: 355.
- VANNIER E., DINARELLO C.A. (1993). Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 β gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells: comparison with IL-1 β receptor antagonist. *J. Clin. Invest.*; **92**: 281–287.
- VEGETO S., GHISLETTI C., MEDA S., ETTERI S., BELCREDITO S., MAGGI A. (2004). Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17 β -estradiol in macrophage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; **91**: 59–66.
- VERCELLI D., JABARA H.H., ARAI K., YOKOTA T., GEHA R.S. (1989). Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *Eur. J. Immunol.*; **19**: 1419–1424.
- VERCELLI D., JABARA H.H., LAUENER R.P., GEHA R.S. (1990). IL-4 inhibits the synthesis of IFN- γ and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J. Immunol.*; **144**: 570–573.
- VERMEIRE K., HEREMANS H., VANDEPUTTE M., HUANG J., BILLIAU A., MATTHYS P. (1997). Accelerated collagen-induced arthritis in interferon- γ receptor-deficient mice. *J. Immunol.*; **158**: 5507–5513.
- VERWEIJ C.L., GEERTS M., AAARDEN L.A. (1991). Activation of interleukin 2 gene transcription via the T cell surface molecule CD28 is mediated through an Nf-B-like response element. *J. Biochem.*; **266**: 14179–14182.
- VIEIRA P., DE WAAL MALEFYT R., DANG W., JOHNSON K.E., KASTELEIN R., FIORENTINO D.F., DE VRIES J.E., RONCAROLO M.G., MOSSMANN T.R., MOORE K.W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) cDNA clones: homology to Epstein Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **88**: 1172–1176.
- VIGERS G.P., CAFFES P., EVANS R.J., THOMPSON R.C., EISENBERG S.P., BRANDHUBER B.J. (1994). X-ray structure of interleukin-1 receptor antagonist at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.*; **269**: 12874–12879.
- VINCENTI F., KIRKMAN R., LIGHT S., BUMGARDNER G., PESCOVITZ M., HALLORAN P., NEYLAN J., WILKINSON A., EKBERG H., GASTON R., BACKMAN L., BURDICK J. (1998). Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.*; **338**: 161–165.

- VINK A., COULIE P.G., WAUTERS P., NORDAN R.P., VAN SNICK J. (1988). B cell growth and differentiation activity of interleukin-HP1 and related murine plasmacytoma growth factors. Synergy with interleukin 1. *Eur. J. Immunol.*; **18**: 607–612.
- VINK A., COULIE P., WARNIER G., RENAULD J.C., STEVENS M., DONCKERS D., VAN SNICK J. (1990). Mouse plasmacytoma growth in vivo: enhancement by interleukin 6 (IL-6) and inhibition by antibodies directed against IL-6 or its receptor. *J. Exp. Med.*; **172**: 997–1000.
- VISSER J., VAN BOXEL-DEZAIRE A., METHORST D., BRUNT T., DE KLOET E.R., NAGELKERKEN L. (1998). Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood*; **91**: 4255–4264.
- VOGELS M.T. E., MENSINK E.J.B. M., YE K., BOERMAN O.C., VERSCHUEREN C.M. M., DINARELLO C.A., VAN DER MEER J.W. M. (1994). Differential gene expression for IL-1 β receptor antagonist, IL-1 β and TNF α receptors and IL-1 β and TNF α synthesis may explain IL-1 β -induced resistance to infection. *J. Immunol.*; **153**: 5772–5780.
- WADA T., TOMOSUGI N., NAITO T. (1994). Prevention of proteinuria by administration of anti-interleukin-8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*; **180**: 1135–1140.
- WAGNER K.E., MARTINEZ J.M., VATH S.D., SNIDER R.H., NYLEN E.S., BECKER K.L., MULLER B., WHITE J.C. (2002). Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs. *Crit Care Med.*; **30**: 2313–2321.
- WALDMANN T.A., O'SHEA J. (1998). The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.*; **10**: 507–512.
- WALMSLEY M., KATSIKIS P.D., ABNEY E., PARRY S., WILLIAMS R.O., MAINI R.N., FELDMANN M. (1996). Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*; **39**: 495–503.
- WALSH C.J., SUGERMAN H.J., MULLEN P.G., CAREY P.D., LEEPER-WOODFROD S.K., JESMOK G.J., ELLIS E.F., FOWLER A.A. (1992). Monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha attenuates cardiopulmonary dysfunction in porcine gram-negative sepsis. *Arch. Surg.*; **127**: 138–145.
- WANG C.Q., UDUPA K.B., LIPSCHITZ D.A. (1995). Interferon- γ exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J. Cell. Physiol.*; **162**: 134–138.
- WANG P., WU P., ANTHES J.C., SIEGEL M.I., EGAN R.W., BILLAH M.M. (1994a). Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood*; **83**: 2678–2683.
- WANG P., WU P., SIEGEL M.I., EGAN R.W., BILLAH M.M. (1994b). IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.*; **153**(2): 811-6.
- WANG Y., ARDESTANI S.K., LIANG B., BECKHAM C., WATSON R.R. (1994). Anti-IL-4 monoclonal antibody and IFN- γ administration retards development of immune dysfunction and cytokine dysregulation during murine AIDS. *Immunology*; **83**: 384–389.
- WANIDWORANUN C., STROBER W. (1993). Predominant role of tumor necrosis factor- α in human monocyte IL-10 synthesis. *J. Immunol.*; **151**: 6853–6861.
- WARREN H.S. (2005). Toll-like receptors. *Crit Care Med.*; **33**: 457-459.
- WARREN H.S., KINNEAR B.F., PHILLIPS J.H., LANIER L.L. (1995). Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J. Immunol.*; **154**: 5144–5152.
- WARRINGA R.A., KOENDERMAN L., KOK P.T. (1991). Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood*; **77**: 2694–2700.

- WASSERMAN D., IOANNOVICH J.D., HINZMANN R.D., DEICHSEL G., STEINMANN G.G. (1998). Interferon-gamma in the prevention of severe burn-related infections: a European phase III multicenter trial. The Severe Burns Study Group. *Crit. Care Med.*; **26**: 434–439.
- WATANABE Y., KURIBAYASHI K., MIYATAKE S. *et al.* (1989). Endogenous expression of mouse interferon cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells results in reduced tumorigenicity and augmented anti-tumor immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **86**: 9456–9460.
- WATANABE Y., JACOB C.O. (1991). Regulation of MHC Class II antigen expression. Opposing effects of tumor necrosis factor- α on IFN- γ -induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell. *J. Immunol.*; **146**: 899–899.
- WATERHOUSE P., MARENGERE L.E., MITTRUCKER H.W., MAK T.W. (1996). CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol. Rev.*; **153**: 183–207.
- WAYMAN N., MCDONALD M. C., THREADGILL M. D., THIEMERMANN C. (2001) 5 Amino isoquinolinone, a potent inhibitor of poly (adenosine 5 diphosphate ribose) polymerase, reduces myocardial infarct size. *Eur. J. Pharmacol.*; **430**: 93–100.
- WESCHE-SOLDATO D.E., SWAN R.Z., CHUNG C.S, AYALA A. (2007). The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets*; **8**: 493-500.
- WESTENDORP R.G., LANGERMANS J.A., HUIZINGA T.W., ELOUALI A.H., VERWEIJ C.L., BOOMSMA D.I., VANDENBROUCKE J.P., VANDENBROUKE J.P. (1997). Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*; **349**: 170–173.
- WETZLER M., KURRZOCK R., ESTROV Z., KANTARJIAN H., GISSLINGER H., UNDERBRINK M.P., TALPAZ M. (1994). Altered levels of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in chronic myelogenous leukemia: clinical and prognostic correlates. *Blood*; **84**: 3142–3147.
- WHELAN J.A., RUSSELL N.B., WHELAN M.A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods.*; **278(1-2)**: 261-9.
- WHITE C.W., GHEZZI, P. (1989). Protection against pulmonary oxygen toxicity by interleukin-1 and tumor necrosis factor: role of antioxidant enzymes and effect of cyclooxygenase inhibitors. *Biotherapy*; **1**: 361–367.
- WHITE M.V., YOSHIMURA T., HOOK W. (1989). Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol. Lett.*; **22**: 151–154.
- WIINBERG B., SPOHR B., DIETZ H.H., EGELUND T., GREITER-WILKE A., McDONOUGH S.P., OLSEN J., PRIESTNALL S., CHANG Y.F., SIMPSON K.W. (2005). Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to Helicobacter spp. infection. *J Vet Intern Med.*; **19**: 4-14.
- WILLEMS F., MARCHANT A., DELVILLE J.P., GERARD C., DELVAUX A., VELU T., DE BOER M., GOLDMAN M. (1994). Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.*; **24**: 1007–1009.
- WILLIAMS R.O., FELDMANN M., MAINI R.N. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **89**: 9784–9788.
- WILLIAMS R.O., WILLIAMS D.G., FELDMANN M., MAINI R.N. (1993). Increased limb involvement in murine collagen-induced arthritis following treatment with anti-interferon- γ . *Clin. Exp. Immunol.*; **92**: 323–327.
- WINDSOR W.T., SYTO R., TSARBOPOULOS A., ZHANG R., DURKIN J., BALDWIN S., PALIWAL S., MUI P.W., PRAMANIK B., TROTTA P.P., TINDALL S.H. (1993). Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry*; **32**: 8807–8815.
- WLODAWER A., PAVLOVSKY A., GUSTCHINA A. (1992). Crystal structure of human recombinant IL-4 at 2.25 Å resolution. *FEBS Lett.*; **309**: 59–64.

- WOERLY G., ROGER N., LOISEAU S., CAPRON M. (1999). Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.*; **118**: 95–97.
- WOGENSEN L., HUANG X., SARVETNICK N. (1993). Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J. Exp. Med.*; **178**: 175–185.
- WOGENSEN L., LEE M.S., SARVETNICK N. (1994). Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.*; **179**: 1379–1384.
- WU R.Q., XU Y.X., SONG X.H., CHEN L.J., MENG X.J. (2002). Relationship between cytokine mRNA expression and organ damage following cecal ligation and puncture. *World J Gastroenterol.*; **8**(1): 131–4.
- XU G.-Y., HONG J., MC DONAGH T., STAHL M., KAY L., SEEHRA J., CUMMING D. (1996). Complete 1H, 15N and 14C assignments, secondary structure, and topology of recombinant human interleukin-6. *J. Biomol. NMR*; **8**: 123–135.
- XU J., KIM G.M., CHEN S., YAN P., AHMED S.H., KU G., BECKMAN J.S., XU X.M., HSU C.Y. (2001). iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *J Neurotrauma*; **18**: 523–532.
- XU X., SUN Y.L., HOEY T. (1996). Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT. *Science*; **273**: 794–797.
- YAEGASHI Y., NIELSEN P., SING A., GALANOS C., FREUDENBERG M.A. (1995). Interferon γ , a cofactor in the interferon production induced by gram-negative bacteria in mice. *J. Exp. Med.*; **181**: 953–960.
- YAMADA Y., KIRILLOVA I., PESCHON J.J., FAUSTO N. (1997). Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **94**: 1441–1446.
- YAMAMOTO K., ARAKAWA T., UEDA N., YAMAMOTO S. (1995) Transcriptional roles of nuclear factor κ B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor- α -dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3–E1 cells. *J. Biol. Chem.*; **270**: 31315–31320.
- YANG-YEN H.-F., CHAMBARD J.-C., SUN Y.-L., SMEAL T., SCHMIDT T.J., DROUIN J., KARIN M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein–protein interaction. *Cell*; **62**: 1205–1215.
- YASUKAWA K., HIRANO T., WATANABE Y., MURATANI K., MATSUDA T., NAKAI S., KISHIMOTO T. (1987). Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J.*; **6**: 2939–2945.
- YE J., GHOSH P., CIPPITELLI M. *et al.* (1994). Characterization of a silencer regulatory element in the human interferon- γ promoter. *J. Biol. Chem.*; **269**: 25728–25734.
- YEAMAN G.R., COLLINS J.E., CURRIE J.K., GUYRE P.M., WIRA C.R., FANGER M.W. (1998). IFN- γ is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.*; **160**: 5145–5153.
- YOCUM D.E., ESPARZA L., DUBRY S., BENJAMIN J.B., VOLZ R., SCUDERI P. (1989). Characteristics of tumor necrosis factor production in rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.*; **122**: 131–145.
- YOSHIOKA Y., KUDO S., NISHIMURA H., YAJIMA T., KISHIHARA K., SAITO K., SUZUKI T., SUZUKI Y., KUROIWA S., YOSHIKAI Y. (2005). Oral administration of bovine colostrum stimulates intestinal intraepithelial lymphocytes to polarize Th1-type in mice. *Int Immunopharmacol.*; **5**(3): 581–90.
- YOSHIZAKI K., MATSUDA T., NISHIMOTO N., KURITANI T., TAEHO L., AOZASA K., NAKAHATA T., KAWAI H., TAGOH H., KOMORI T., KISHIMOTO S., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1989). Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*; **74**: 1360–1367.
- YOUNG H.A. (1996). Regulation of interferon- γ gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.*; **16**: 563–568.
- YOUNG H.A., GHOSHI P., YE E. *et al.* (1994). Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- γ gene. *J. Immunol.*; **153**: 3603–3610.

- YOUNG H.A., HARDY K.J. (1995). Role of interferon- γ in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.*; **58**: 373–381.
- YU, C.L., HASKARD, D.O., CAVENDER, D., JOHNSON, A., ZIFF, M. (1985). Human interferon increases the binding of T lymphocytes to endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*; **62**: 554–560.
- YUNE T.Y., KIM S.J., LEE S.M., LEE Y.K., OH Y.J., KIM Y.C., MARKELONIS G.J., OH T.H. (2004). Systemic administration of 17 β -estradiol reduces apoptotic cell death and improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*; **21**: 293-306.
- ZDANOV A., SCHALK-HIHI C., WLODAWER A. (1996). Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci.*; **5**: 1955–1962.
- ZHANG Y., LIN J.X., VILCEK J. (1988a). Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*; **263**: 6177–6182.
- ZHANG Y.H., LIN J.X., YIP Y.K., VILCEK J. (1988b). Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **85**: 6802–6805.
- ZHENG H., FLETCHER D., KOZAK W., JIANG M., HOFMANN K., CONN C.C., SISZYNSKI D., GRABIEC C., TRUMBAUER M.A., SHAW A.R., KOSTURA M.J., STEVENS K., ROSEN H., NORTH R.J., CHEN H.Y., TOCCI M.J., KLUGER M.J., VAN DER PLOEG L.H. T. (1995). Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 deficient mice. *Immunity*; **3**: 9–19.
- ZIMMER T., JONES P.P. (1990). Combined effects of tumor necrosis factor- α , prostaglandin E₂, and corticosterone on induced Ia expression on murine macrophages. *J. Immunol.*; **145**: 1167–1167.
- ZUANY-AMORIM C., HAILE S., LEDUC D., DUMAREY C., HUERRE M., VARGAFTIG B.B., PRETOLANI M. (1995). Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J. Clin. Invest.*; **95**: 2644–2651.
- ZUCALI J.R., MOREB J., GIBBONS W., ALDERMAN J., SURESH A., ZHANG Y., SHELBY B. (1994). Radioprotection of hematopoietic stem cells by interleukin-1. *Exp. Hematol.*; **22**: 130–135.