

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO
DOTTORATO di SCIENZE BIOMEDICHE ED ONCOLOGIA
XXXII CICLO



TESI di DOTTORATO

**L'IMMUNOFENOTIPO T e B LINFOCITARIO NELLE
PATOLOGIE IMMUNOREUMATOLOGICHE: DAL
LABORATORIO ALLA MEDICINA DI PRECISIONE**

Relatore:

Prof. Giovanni Battista Ferrero

Candidato:

Dott. Francesco Licciardi

INDICE ANALITICO

I. L'eterogenità della risposta immunitaria	3
II. L'Immunofenotipo T e B linfocitario	8
L'immunofenotipo B linfocitario	9
L'immunofenotipo T linfocitario	12
III. L'Immunofenotipo nella Sindrome da Del22q11	16
Sezione Sperimentale.....	19
Futura Evoluzione del Progetto.....	24
IV. L'Immunofenotipo per comprendere l'immunopatogenesi delle nuove PID	26
Il deficit di NFKB2	28
Altri Progetti.....	31
V. L'Immunofenotipo sinoviale nell'artrite idiopatica giovanile	34
Sezione Sperimentale.....	36
Evoluzione del Progetto.....	41
VI. I Fenotipi clinici indotti da SARS-CoV2 in pediatria e il loro Immunofenotipo	45
i Geloni e l'infezione da SARS-Cov2.....	46
La multi-inflammatory Syndrome in children	49
VII. Conclusioni e prospettive future	54

I. L'ETEROGENITÀ DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

CONTRIBUTI PUBBLICATI SULL'ARGOMENTO DURANTE IL PHD

- I. **Licciardi F**, van den Boogaard M, DellePiane M, Tovo PA, Montin D. *EBV-Related Hodgkin Lymphoma in an ICF2 Patient: Is EBV Susceptibility a Hallmark of This ICF Subtype?* J Clin Immunol. 2019 Apr
- II. van den Boogaard ML, Thijssen PE, Aytakin C, **Licciardi F**, Kiykim AA, Sposito L,, van der Maarel SM. *Expanding the mutation spectrum in ICF syndrome: Evidence for a gender bias in ICF2.* Clin Genet. 2017 Oct;
- III. **Licciardi F**, Montin D, Versace A, Migliore G, Tzialla C, Fellay J, Borghesi A. *Familial segregation of group B streptococcal infection in a consanguineous kindred.* Int J Infect Dis. 2016 Oct
- IV. Carli D, Giorgio E, Pantaleoni F, Bruselles A, Barresi S, Riberi E, **Licciardi F**, ..., Tartaglia M. *NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype-phenotype correlations.* Hum Mutat. 2019 Jun;
- V. Baldini L, Di Sabatino F, Bodrero E, Dellepiane M, Covizzi C, La Selva R, Montin D, **Licciardi F**. *NeMO mutations: a rare cause of monogenic Behçet-like disease.* Rheumatology (Oxford). 2020 Sep;

Il sistema immunitario è chiamato a proteggere l'individuo da una moltitudine di patogeni e stimoli immunogenici diversi. La risposta immunitaria per essere efficiente deve essere: sufficientemente rapida da arginare la diffusione del patogeno nell'individuo, sufficientemente precisa da impedire eccessivi danni all'ospite e sufficientemente duratura da permettere una protezione a lungo termine, qualora l'individuo avesse un nuovo contatto con il patogeno.

Nell'ultimo secolo il succedersi di studi, sempre più approfonditi, ha permesso di caratterizzare meglio le cellule coinvolte nello sviluppo dell'immunità e comprendere i complessi meccanismi di regolazione in grado di determinare una risposta che soddisfi i tre requisiti prima menzionati. Il grande sviluppo dell'immunologia di base dopo gli anni '50 ha permesso di teorizzare un modello di risposta immunitaria comune a tutti gli esseri umani che si regge su due pilastri: l'immunità innata e quella adattiva.

Nelle ultime decadi tuttavia è emerso come, benchè le cinetica e gli attori in gioco nella risposta immunitaria siano comuni, esistano numerose differenze interindividuali. Tali differenze sono talora marcate e determinano l'eterogeneità di gravità clinica di malattie infettive estremamente diffuse. Un esempio lampante di questa eterogeneità è indubbiamente costituito dalla risposta al SARS-CoV: l'ospite infettato può infatti sviluppare quadri clinici estremamente variabili che vanno dalla asintomaticità assoluta fino a forme fatali. Studi sul SARS-CoV2 hanno dimostrato che i pazienti con infezione severa hanno un minor numero di linfociti e un incremento di alcune citochine proinfiammatorie rispetto ai casi più lievi, suggerendo come una non ottimale risposta al virus dell'ospite sia evidenziabile nella maggior parte dei soggetti affetti da forme gravi.^{1,2}

Il ruolo fondamentale di varianti ipomorfe in geni chiave dell'immunità nella predisposizione a decorsi severi di SARS-COV2 è analogo a quanto osservato in altre patologie infettive pediatriche, quali per esempio le encefaliti erpetiche o le micobatteriosi^{3,4}. È verosimile che tali mutazioni possano essere riscontrate anche in cluster familiari con una spiccata predisposizione a sviluppare malattie invasive batteriche a esordio precoce come la sepsi da *Streptococcus agalactiae*⁵.

La spiccata eterogeneità delle risposte del sistema immunitario è un evento di frequente osservazione anche in numerose patologie immunoreumatologiche monogeniche e non. In ambito immunologico, per esempio, non è raro osservare come pazienti con mutazioni a carico di uno stesso gene abbiano fenotipi estremamente differenti da un punto di vista clinico e laboratoristico.

Le differenze possono essere imputabili a vari fattori, in primis la tipologia/sede della mutazione. Paradigmatico a tal proposito è il fenotipo dei pazienti affetti da mutazioni a carico del gene NBAS (neuro-blastoma amplified sequence). Mutazioni a carico del gene sono responsabili di due fenotipi clinici distinti: uno caratterizzato da insufficienza epatica infantile ricorrente (ILF2 MIM# 616483)⁶, l'altro caratterizzato da un quadro sindromico complesso con bassa statura, atrofia del nervo ottico, anomalie peculiari allo striscio (iposegmentazione dei neutrofili o anomalia di Pelger-Huet) e immunodeficienza combinata⁷. Recentemente abbiamo dimostrato come la principale determinante della presenza o meno di immunodeficienza combinata (CID) nei pazienti con mutazioni di NBAS sia la posizione stessa della mutazione. In particolare i pazienti con CID hanno mutazioni missenso a carico delle regioni C-terminali o N-terminali della proteina⁸.

Il tipo di mutazione non è però in grado di spiegare la variabilità del fenotipo clinico in numerose malattie monogeniche. Recentemente, per esempio, il nostro gruppo ha descritto un caso di linfoma EBV indotto in un paziente affetto da ICF di tipo 2⁹. L'ICF è una patologia

rara, recessiva caratterizzata dalla coesistenza di immunodeficienza, instabilità centromerica e anomalie faciali. Ad oggi sono noti quattro sottotipi genetici di ICF, il sottotipo 2 è dovuto a mutazioni a carico di ZBTB24, un oncosoppressore coinvolto nella metilazione delle aree iuxtacentromeriche. I pazienti noti affetti da ICF2 sono 29, con una predominanza maschile¹⁰. Nel lavoro, oltre alla descrizione clinica del caso, abbiamo sottolineato come siano descritti in letteratura altri 3 pazienti ICF2 con complicanze gravi/fatali imputabili ad uno scarso controllo da EBV (1 linfocitosi emofagocitica, una mononucleosi severa e 1 infezione cronica fatale). Questo dato dimostra come le mutazioni di ZBTB24 predispongano a un non ottimale controllo di questo virus nonostante una terapia sostitutiva con immunoglobuline adeguata. In questo caso, tuttavia, l'analisi delle mutazioni di questi quattro pazienti non ha evidenziato una correlazione genotipo-fenotipo, portandoci a concludere che altri fattori ambientali e genetici siano necessari, oltre alla mutazione di ZBTB24, per determinare la suscettibilità all'EBV in questi pazienti⁹.

Anche in ambito reumatologico lo sviluppo di fenotipi severi in malattie monogeniche può non essere riconducibile a una correlazione genotipo-fenotipo stretta. È per esempio il caso dello sviluppo di malattia di Behcet nelle pazienti affetti da incontinentia pigmentii (IP).

L'IP è una genodermatosi X-linked dominante dovuta a mutazioni a carico di IKBKG, un modulatore fondamentale per l'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB. Mutazioni di IKBKG sono associate nel maschio a immunodeficienze gravi caratterizzate da displasia ectodermica ipodrotica con o senza osteopetrosi e linfedema (MIM #300301 e #300291), o a forme ricorrenti invasive di sepsi pneumococciche (MIM #300640). Nelle femmine le mutazioni di IKBKG causano invece l'IP, una malattia che colpisce prevalentemente la cute e gli annessi caratterizzata da evidenti depositi di melanina lungo le linee di Blaschko. Recentemente su *Rheumatology* abbiamo descritto lo sviluppo, in una paziente affetta da IP, di un fenotipo Behcet-like caratterizzato da artrite ricorrente, aftosi orale e genitale e marcato rialzo degli indici di flogosi. L'analisi sistematica della letteratura ci ha permesso di identificare altri 10 pazienti affetti da IP e Behcet, nei casi familiari le due malattie segregavano insieme suggerendo un nesso stretto tra la mutazione di IKBKG e lo sviluppo di questo fenotipo infiammatorio. Tuttavia, neanche in questo caso l'analisi delle mutazioni ha permesso l'identificazione di un chiaro nesso genotipo-fenotipo, suggerendo che altri fattori genetici e/o ambientali siano necessari per determinare il fenotipo¹¹.

La variabilità fenotipica caratterizza anche patologie immunoreumatologiche non monogeniche estremamente comuni, come per esempio l'artrite idiopatica giovanile e la sindrome da Del22q11.

L'artrite idiopatica giovanile è la forma di artrite cronica più frequente in età pediatrica, con una prevalenza stimata di circa 1:2000-1:4000 nati. Il decorso clinico e la risposta terapeutica sono estremamente variabili potendo oscillare da forme lievi che coinvolgono poche articolazioni responsive a singole infiltrazioni di steroide, a forme più gravi con coinvolgimento di numerose articolazioni e/o che necessitano di terapia cronica con farmaci immunosoppressori¹². La sindrome da delezione del cromosoma 22q11.2 è una malattia genetica causata da una microdelezione in emizigosi sul braccio lungo del cromosoma 22. La sua prevalenza è stimata tra 1:2000 e 1:4000 nati, senza differenza tra maschi e femmine, rendendola la più comune sindrome da microdelezione nella specie umana. Il quadro clinico è caratterizzato dall'associazione di dismorfismi faciali, alterazioni cardiache, immunodeficienza T cellulare e ipocalcemia neonatale. Il coinvolgimento immunologico nella Del22q11 è estremamente eterogeneo, potendosi estrinsecare sia in forme silenti dal punto di vista clinico e laboratoristico che in forme di immunodeficienza più evidente fino, rarissimamente, a un quadro di Immunodeficienza Severa Comune Combinata¹³.

In entrambe le malattie numerosi studi hanno cercato di identificare varianti genetiche o fattori ambientali favorevoli allo sviluppo di fenotipi più gravi. Benchè i dati di letteratura siano numerosi, nessuno di questi fattori è in grado di predire l'evoluzione del quadro clinico, rendendo difficile la formulazione di programmi di follow-up e terapia personalizzati sul singolo paziente.

L'eterogeneità della risposta interindividuale alle infezioni, l'assenza di una corrispondenza fra genotipo e fenotipo in patologie monogeniche e il pleiomorfismo clinico delle patologie multifattoriali altro non sono che manifestazioni diverse della variabilità interindividuale della risposta immune. Tale variabilità è verosimilmente imputabile a una molteplicità di fattori genetici e ambientali, la cui completa comprensione appare ancora lontana. Tuttavia, è plausibile che in patologie con una così spiccata componente disimmune lo studio dell'immunità adattativa possa dare importanti informazioni sul tipo di risposta immunologica specifica del soggetto stesso, permettendo di suddividere gruppi eterogenei di pazienti in categorie immunologiche e cliniche omogenee.

Partendo da questi presupposti, durante gli anni di dottorato ho cercato di comprendere se lo studio sistematico dei linfociti T e B mediante citofluorimetro possa non solo contribuire alla comprensione della patogenesi di malattie complesse, ma anche permettere l'identificazione precoce di pazienti con fenotipi più gravi, con ripercussioni immediate nella gestione clinica.

In questo manoscritto ho voluto ripercorrere i risultati salienti della mia attività di ricerca in questi anni. La trattazione è suddivisa in capitoli, in ciascuno dei quali viene dimostrata l'applicazione della citofluorimetria a diverse patologie o gruppi di patologie. L'attività di ricerca di questi anni mostra come la tipizzazione linfocitaria sia uno strumento versatile, utile nello studio di patologie estremamente eterogenee. Dopo una parte introduttiva sulla fenotipizzazione T e B linfocitaria, verranno analizzate dapprima le ricerche svolte in ambito immunologico nella sindrome da Del22q11 e in immunodeficienze monogeniche, quali il difetto di NFKB2 e CD40 ligando, indi verranno esposti i risultati di interesse reumatologico nell'ambito dell'AIG. Infine verranno riportati i risultati relativi ad uno studio attualmente ancora in corso sull'immunofenotipizzazione nei pazienti pediatrici affetti da SARS-CoV2 e nei pazienti affetti da MIS-C (Multisystem Inflammatory Syndrome in Children).

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO

1. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, et al., Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020 Sep
2. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study, *Lancet*. 2020
3. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 2007 Sep
4. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity. *Semin Immunol*. 2014 Dec;

5. Licciardi F, Montin D, Versace A, Migliore G, Tzialla C, Fellay J, Borghesi A. Familial segregation of group B streptococcal infection in a consanguineous kindred. *Int J Infect Dis.* 2016 Oct
6. Staufner C, Haack TB, Köpke MG, Straub BK, Kölker S, et al. Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts. *J Inherit Metab Dis.* 2016 Jan
7. Maksimova N, Hara K, Nikolaeva I, Chun-Feng T, Usui T, et al. Neuroblastoma amplified sequence gene is associated with a novel short stature syndrome characterised by optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly. *J Med Genet.* 2010 Aug
8. Carli D, Giorgio E, Pantaleoni F, Bruselles A, Barresi S, et al. NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2019 Jun;
9. Licciardi F, van den Boogaard M, DellePiane M, Tovo PA, Montin D. EBV-Related Hodgkin Lymphoma in an ICF2 Patient: Is EBV Susceptibility a Hallmark of This ICF Subtype? *J Clin Immunol.* 2019 Apr
10. van den Boogaard ML, Thijssen PE, Aytakin C, Licciardi F, Kiykim AA, et al. Expanding the mutation spectrum in ICF syndrome: Evidence for a gender bias in ICF2. *Clin Genet.* 2017 Oct
11. Baldini L, Di Sabatino F, Bodrero E, Dellepiane M, Covizzi C, La Selva R, Montin D, Licciardi F. NeMO mutations: a rare cause of monogenic Behçet-like disease. *Rheumatology (Oxford).* 2020 Sep;
12. Petty R, Laxer R, Lindsley C, Wedderburn L. *Textbook of Pediatric Rheumatology.* Elsevier 2016
13. Cancrini C, Puliafito P, Digilio MC, Soresina A, Martino S, et al. Clinical features and follow-up in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr.* 2014 Jun

II. L'IMMUNOFENOTIPO T E B LINFOCITARIO

L'IMMUNOFENOTIPO B LINFOCITARIO

L'insieme dei linfociti B circolanti nel sangue periferico è costituito da diverse sottopopolazioni, differenziabili in citofluorimetria mediante l'identificazione di proteine espresse sulla superficie cellulare, che riflettono diversi stadi di maturazione e differenziazione. Per comprendere il significato delle varie sottopopolazioni B linfocitarie è dunque necessario analizzare lo sviluppo dei linfociti B, che può essere schematicamente suddiviso in una *fase centrale* (midollare) e in una *fase periferica* (a livello degli organi linfoidi, quali milza e linfonodi): quest'ultima è a sua volta suddivisibile in una fase *antigene-indipendente* e in una fase *terminale antigene-dipendente*.

Fase centrale

Lo sviluppo precoce dei linfociti B dalle cellule staminali emopoietiche non richiede la presenza dell'antigene (antigene-indipendente) e avviene a livello del midollo osseo emopoietico.

I linfociti **pro-B** (CD19⁻CD10^{+/-}CD20⁻CD22⁺CD24⁻vpreB⁻Igα^{-/+}) sono caratterizzati dall'espressione di CD22, il più precoce antigene di superficie caratteristico della linea B; tali linfociti tuttavia non esprimono ancora il recettore immunoglobulinico di superficie (B Cell Receptor, BCR). La comparsa sulla superficie cellulare della catena pesante del BCR, associata alla catena leggera surrogata, identifica lo stadio del linfocita **pre-B** (CD19⁺CD10⁺CD20⁻CD24⁺⁺vpreB⁺Igα⁺); a questo stadio compare il *marker* di superficie CD19 e avviene la prima selezione positiva sulla base del corretto assemblaggio del recettore¹. Dopo alcuni cicli di replicazione, la catena leggera surrogata viene sostituita da una catena leggera di tipo κ o λ , associata a una catena pesante μ ; l'espressione di un BCR di tipo IgM permette la successiva selezione negativa sulla base della specificità recettoriale, e identifica lo stadio di linfocita **B immaturo** (CD19⁺CD10⁺CD20⁺CD24⁺⁺IgM⁺). Diversi difetti genetici che interferiscono con questo processo di maturazione sono causa nell'uomo di immunodeficienze primitive.

A questo punto della sua maturazione il linfocita B è pronto ad abbandonare il midollo osseo raggiungendo circolo ematico; tuttavia solamente il 10-12% dei linfociti B immaturi arriva negli organi linfoidi periferici: i rimanenti subiscono un processo di selezione negativa antigene-specifica che consente l'eliminazione delle cellule autoreattive². Nell'individuo sano i linfociti pro-B, pre-B e B immaturi non sono riscontrabili nel sangue periferico.

Fase periferica

Il linfocita B recentemente emigrato dal midollo osseo viene denominato **linfocita B transizionale** (*transitional B cell* o *TR*), identificabile dal fenotipo di superficie CD19⁺CD38⁺IgM^{high}. La percentuale di tali linfociti, nel sangue periferico, è bassa (<5% dei linfociti B totali nell'adulto).

Nel topo i linfociti B transizionali attraversano distinte fasi di maturazione³. I linfociti B transizionali T1 hanno un immunofenotipo simile ai linfociti B immaturi; all'interno della milza essi si differenziano in linfociti B transizionali T2 grazie ai segnali stimolatori forniti dall'interazione fra BAFF (B-cell Activating factor, TNFSF13B) e il suo recettore BAFF-R⁴. Anche nell'uomo la maturazione dei linfociti B transizionali avviene in modo simile: deficit genetici di BAFF-R conducono ad un accumulo di linfociti B transizionali immaturi (T1-like) e a una conseguente riduzione delle restanti sottopopolazioni cellulari; tali alterazioni non invariabilmente conducono a una manifesta immunodeficienza⁵.

Dopo aver superato la fase transizionale, i linfociti B maturi vanno incontro a una successiva differenziazione, sulla base della loro localizzazione spaziale e della loro specificità funzionale, in linfociti B della zona marginale e linfociti B follicolari.

I **linfociti B della zona marginale** (*marginal zone B cells* o *MZB*) devono il loro nome all'analoga popolazione B-linfocitaria riscontrata, nel topo, a livello della zona marginale della milza. Nell'uomo sono caratterizzati dall'immunofenotipo CD19⁺CD27⁺IgM⁺IgD⁺ e costituiscono dal 7.4 al 32.5% dei linfociti B circolanti. Dal momento che presentano in superficie CD27, il marker specifico per le cellule di memoria, vengono anche definiti *IgM memory B cells*⁶. Analogamente a quanto avviene nel topo, i linfociti B della zona marginale svolgono un ruolo di primaria importanza nella risposta anticorpale precoce, in particolare ad antigeni polisaccaridici T-indipendenti.

I **linfociti B follicolari** (*follicular B cells*) si localizzano nei follicoli della milza e dei linfonodi e sono la sottopopolazione di linfociti B maggiormente rappresentata nel sangue periferico (così come negli organi linfoidi), con dei valori normali compresi fra 42.6 e 82.3%; immunofenotipicamente sono caratterizzati come CD19⁺CD27⁻IgM⁺IgD⁺. Vengono anche definiti linfociti **B naïve**, in quanto non sono ancora venuti a contatto con il loro specifico antigene; pertanto non esprimono CD27. Sono quindi reclutati nella risposta anticorpale T-dipendente, che avviene a livello del centro germinativo; in seguito al contatto con l'antigene e ai segnali co-stimolatori forniti dai linfociti T helper, i linfociti B follicolari differenziano in plasmablasti oppure in linfociti B di memoria *class-switched*.

Differenziazione terminale antigene-dipendente

I linfociti B attivati dall'incontro con l'antigene partecipano alle reazioni del centro germinativo assieme ai linfociti T helper e alle cellule follicolari dendritiche. I centri germinativi sono siti immunologici altamente specializzati in cui avvengono processi quali lo *switch* isotipico (riarrangiamento della catena pesante delle immunoglobuline, che porta alla produzione di IgA, IgG, IgE), la maturazione dell'affinità anticorpale, la selezione e l'espansione di cloni B cellulari antigene-specifici; tali processi richiedono la cooperazione dei linfociti T helper (CD4⁺), i quali espongono sulla superficie cellulare molecole co-stimolatorie quali CD40L⁷.

In seguito allo switch isotipico alcune cellule si differenziano in cellule di memoria, identificabili dall'espressione del marker di superficie CD27⁸. Tali linfociti B sono quiescenti e non producono immunoglobuline; tuttavia possono essere rapidamente riattivati in plasmacellule grazie all'interazione con il loro linfocita T helper specifico per generare la risposta anticorpale secondaria, caratterizzata da rapidità di insorgenza ed elevata specificità. Il *pool* circolante dei **linfociti B di memoria class-switched** (*class-switched memory B cells*) costituisce il 7.6-31.4% dei linfociti B circolanti, e viene identificato dall'immunofenotipo CD19⁺CD27⁺IgM⁻IgD⁻.⁹

Le **plasmacellule** rappresentano la fase terminale di differenziazione dei linfociti B; esse sono deputate alla produzione di elevate quantità di anticorpi. Plasmacellule possono essere generate sia nelle zone extrafollicolari che nei centri germinativi; mentre le prime hanno vita breve (*short-lived plasma cells*) e producono anticorpi a bassa affinità, le seconde generano una risposta anticorpale durevole e più specifica. Le plasmacellule non sono rilevabili nel circolo ematico: soltanto pochi precursori, definiti **plasmablasti**, possono essere identificati dalla presenza di CD38, marker di superficie tipico delle plasmacellule. I plasmablasti vengono definiti dall'immunofenotipo CD19⁺CD38^{high}IgM⁻. Il loro numero varia a seconda dello stato di attivazione della risposta anticorpale: in seguito a vaccinazione può aumentare anche notevolmente, ma poi ritorna rapidamente sotto il 2% dei linfociti B totali¹⁰.

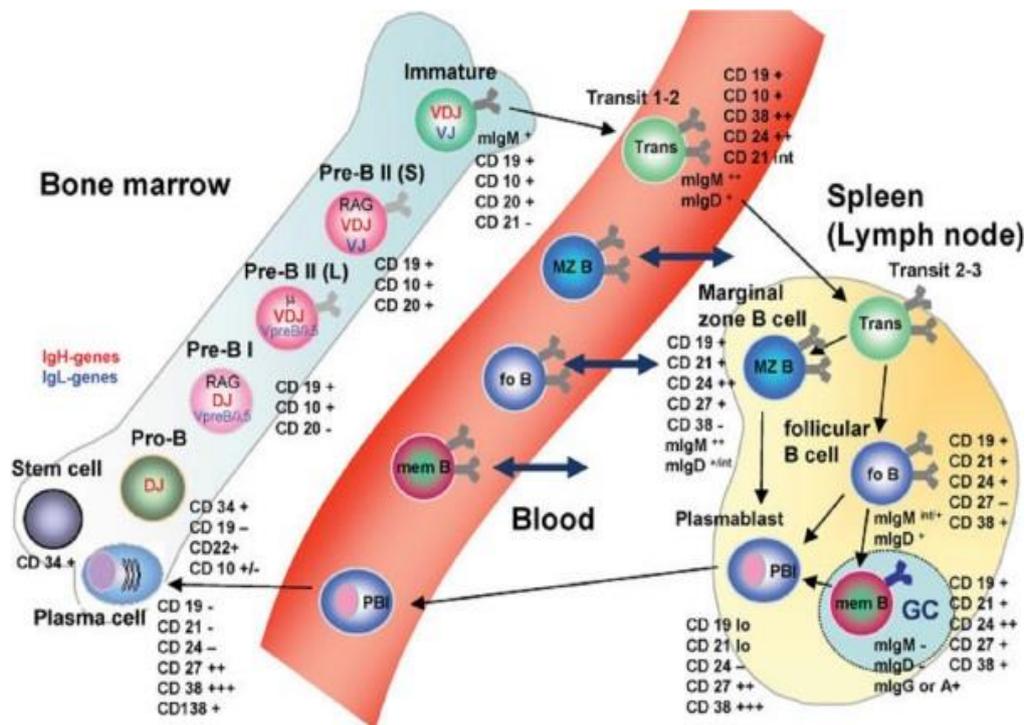


Figura1. Rappresentazione schematica della maturazione B linfocitaria nel midollo osseo, nel sangue e negli organi linfoidi secondari (Warnatz et al.)

In letteratura è stata inoltre segnalata un'anomala sottopopolazione, omogenea per caratteristiche immunofenotipiche e non riconducibile a un preciso stadio di maturazione dei linfociti B, caratterizzata da un'espressione estremamente bassa di CD21 (recettore 2 del complemento, CR2). Tale sottopopolazione, designata originariamente come **CD21low B cells (CD21Lo)**, è stata riscontrata dapprima nei pazienti affetti da LES ¹¹ e nei soggetti con infezione cronica da HIV in fase viremica ¹², e in seguito nei pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile (CVID). Le CD21low B cells presentano IgM di superficie, esprimono elevati livelli di CD19, bassi livelli di CD38, CXCR5 e CCR7, mentre non esprimono CD23. Complessivamente il loro fenotipo fa supporre che si tratti di una popolazione cellulare precedentemente attivata andata successivamente incontro ad attenuazione funzionale (*down-regolazione* di CD21, CD38 e dei recettori per le chemochine); per tale ragione esse vengono anche definite *activated B cells* o *exhausted B cells*. Secondo altri Autori, data la loro somiglianza fenotipica con i linfociti B murini di tipo B1 *tissue-homing*, si tratterebbe di una popolazione di linfociti B a prevalente localizzazione tissutale, coinvolta nella risposta immunitaria innata ¹³.

La tipizzazione B linfocitaria da noi effettuata negli studi trattati in questa tesi di dottorato ci ha permesso di studiare le seguenti popolazioni:

- *Transitional B (Tr)*: CD19+/CD38+/IgM+++
- *B naive*: CD19+/CD27-/IgM+/IgD+
- *B marginal zone (MZB)*: CD19+/CD27+/IgM+/IgD+
- *switched memory B cells (SMB)* : CD19+/CD27+/IgM-/IgD-
- *CD21Low B cells (CD21Lo)*: CD19+/CD38-/CD21 Low
- *Plasmablast (PB)* i: CD19+/CD38+/IgM-

L'IMMUNOFENOTIPO T LINFOCITARIO

I linfociti CD3+ o linfociti T sono divisi tradizionalmente in 3 macrofamiglie:

- **T helper:** stimolano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T, dei linfociti B, dei macrofagi e dei polimorfonucleati attraverso la produzione di citochine. Sono cellule CD3+CD4+.
- **T citotossici:** uccidono le cellule che producono antigeni estranei, come le cellule infettate da patogeni intracellulari. Sono cellule CD3+CD8+.
- **T Natural Killer:** sono cellule CD3+CD56+ che possiedono un'attività antitumorale e antivirale.

La maturazione dei linfociti T segue fasi consecutive che consistono nel riarrangiamento e nell'espressione dei geni del recettore TCR (*T cell receptor*), nella proliferazione cellulare, nella selezione indotta dall'antigene e nell'acquisizione di capacità funzionali.

I linfociti T originano da precursori presenti nel midollo osseo e subiscono il processo di maturazione a livello del timo; i precursori migrano nel timo in uno stadio molto precoce dello sviluppo per cui si può affermare che il timo costituisce la sede principale di sviluppo dei linfociti T.

I **linfociti immaturi** si trovano a livello della corticale esterna del timo, da qui migrano attraverso la corticale, dove si verifica la maggior parte degli eventi maturativi, e infine raggiungono la midollare, dove completano il loro sviluppo prima della fuoriuscita nel torrente circolatorio.

L'ambiente timico fornisce gli stimoli necessari per la proliferazione e la maturazione dei timociti; tali stimoli provengono da cellule presenti nel timo quali cellule epiteliali, macrofagi e cellule dendritiche.

I timociti più immaturi (c-kit+CD44+CD25+) contengono i geni del TCR, ma non esprimono TCR, CD3, la catena alfa/beta, CD4 o CD8; queste cellule sono chiamate timociti doppio-negativi e questa fase è anche nota come stadio **pro-T**. Durante questa fase inizia il riarrangiamento dei geni per il TCR.

Le cellule che completano il riarrangiamento esprimono sia il CD4 che il CD8 e sono quindi definite **doppio-positivo**. In virtù dell'espressione di TCR completi, le cellule a doppia positività rispondono all'antigene e sono soggette alla selezione positiva e negativa. La selezione positiva è il processo attraverso il quale i timociti, i cui TCR si legano con bassa avidità ai complessi peptide-MHC self, sono stimolati a sopravvivere. La selezione positiva fissa la restrizione dell'MHC di classe I o II delle sottopopolazioni di cellule T, assicurando che i linfociti T CD8 siano specifici per i peptidi presentati da molecole MHC di classe I e i linfociti T CD4 per peptidi associati alla classe II. In questo modo si attua il passaggio dallo stadio doppio-positivo allo stadio **singolo-positivo**, caratterizzato dall'espressione sul singolo linfocita o del CD4 o del CD8.

La selezione negativa è il processo attraverso cui i timociti, i cui recettori si legano fortemente agli antigeni self in associazione a molecole MHC self, vanno incontro ad apoptosi. Lo stadio singolo-positivo è l'ultimo stadio di maturazione timica, al termine del quale le cellule, oltre alla maturazione fenotipica, raggiungono anche la maturazione funzionale; le cellule CD4 acquisiscono la capacità di produrre citochine in risposta a

successive stimolazioni e di esprimere molecole effettrici (come CD40L) in grado di attivare macrofagi e linfociti B, mentre le cellule CD8 divengono capaci di produrre molecole ad attività citotossica.

Le cellule T circolanti vengono divise in cellule T naive, a cui non è ancora stato presentato l'antigene e cellule T attivate¹⁴. I linfociti **T attivati** si distinguono dai naive perché esprimono isoforme diverse di CD45. Il CD45 è una tirosina fosfatasi presente a livello di tutti i linfociti e ha il compito di attivare la chinasi src mediante defosforilazione del dominio inibitorio. L'RNA codificante per questa proteina va incontro a splicing alternativo a livello degli esoni 4,5 e 6. I linfociti **T naive** (CD45RA) esprimono l'isoforma più estesa di CD45, quelli attivati (CD45RO) esprimono la forma meno estesa¹⁵.

Oltre alle "classiche" popolazioni di linfociti CD3+ (T helper naive e attivati, T citotossici, T natural killer) lo sviluppo di protocolli di fenotipizzazione sempre più raffinati ha permesso di identificare popolazioni di linfociti T peculiari con funzioni solo in parte note. Tra queste ricordiamo:

- **I linfociti gamma-delta (GDT):** sono cellule T che al posto del TCR usuale costituito dalle catene $\alpha\beta$ esprimono una caratteristica isoforma costituita, come suggerisce il nome, da una catena γ e una catena δ . La percentuale di questi peculiari CD3+ è solitamente inferiore al 10%, tali linfociti risultano più frequenti invece a livello mucosale. I GDT sono cellule ancora in gran parte sconosciute, a differenza degli alfa/beta sono linfociti con un TCR ipovariante, verosimilmente svolgono un ruolo chiave nell'immunità innata riconoscendo, tra gli altri, antigeni lipidici. Fenotipicamente sono identificati come CD3+ TCR $\gamma\delta$ ⁺.¹⁶
- **I linfociti doppi negativi (DNT):** sono cellule T che esprimono un TCR $\alpha\beta$ ma non esprimono né il CD4 né il CD8. Secondo alcuni autori i DNT sono dei linfociti CD8+ che sono stati stimolati attraverso il TCR da Antigeni self (hanno infatti un fenotipo di cellule mature "end-stage" poiché esprimono alto TCR e CD45RA+RO-) ma non sono andati in apoptosi. Fenotipicamente sono identificati come CD3+ TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8-.^{17,18}
- **I linfociti T regolatori (Treg):** sono linfociti T che svolgono una funzione di inibizione della risposta immune. Essi sono definiti fenotipicamente dalla presenza sulla membrana di CD3, da un'elevata espressione di CD25 (subunità inducibile del recettore di IL-2) e dall'assenza di CD127 (recettore di IL-7); tuttavia il marker più specifico dei T reg risulta a tutt'oggi essere il fattore trascrizionale forkhead box P3 (FoxP3), che è indispensabile per il loro sviluppo, il loro mantenimento e il loro corretto funzionamento. Pertanto, essi vengono solitamente identificati come CD3+CD25^{high}FoxP3+CD127^{low}.¹⁹
- **I linfociti T follicolari (Tfh):** sono le cellule T CD4+ che interagiscono attivamente con il linfocita B a livello del centro germinativo, permettendo in estrema sintesi il miglioramento dell'affinità anticorpale e lo sviluppo di B memoria. Vengono identificati come linfociti CD3+CD4+CXCR5+. Possono essere a loro volta divisi in Tfh "classici" e **T follicolari regolatori (Tfr)** in base all'espressione del FoxP3, assente nei primi e presente nei secondi.²⁰

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO

1. Melchers F, Ten Boekel E, Seidl T, et al. Repertoire selection by pre-b-cell receptors and b-cell receptors, and genetic control of b-cell development from immature to mature b cells. Immunological Reviews. 2000.

2. Rolink AG, Andersson J, Melchers F. Characterization of immature b cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur. J. Immunol.* 1998.
3. Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, et al. Resolution of three nonproliferative immature splenic b cell subsets reveals multiple selection points during peripheral b cell maturation. *J Immunol.* 2001.
4. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. Baff and april: a tutorial on b cell survival. *Annual review of immunology.* 2001.
5. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009.
6. Weller S, Braun MC, Tan BK, et al. Human blood igm "memory" b cells are circulating splenic marginal zone b cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood.* 2004.
7. MacLennan I. Germinal centers. *Annual Review of Immunology.* 1994.
8. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (ig)m+igd+ peripheral blood b cells expressing the cd27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: cd27 as a general marker for somatically mutated (memory) b cells. *The Journal of Experimental Medicine.* 1998.
9. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, et al. Icos is essential for effective t-helper-cell responses. *Nature.* 2001.
10. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory b cells. *Science.* 2002.
11. Wehr C, Eibel H, Masilamani M, et al. A new cd21low b cell population in the peripheral blood of patients with sle. *Clinical Immunology.* 2004.
12. Moir S, Ho J, Malaspina A, et al. Evidence for hiv-associated b cell exhaustion in a dysfunctional memory b cell compartment in hiv-infected viremic individuals. *The Journal of Experimental Medicine.* 2008.
13. Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, et al. Circulating cd21low b cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like b cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009.
14. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Le basi patologiche delle malattie.* Elsevier; 2005.
15. Oberdoerffer S, Moita LF, Neems D, et al. Regulation of cd45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnnp1l. *Science.* 2008
16. Wu, J. Yang, X. Li, e J. Chen, «The Role of $\gamma\delta$ T Cells in Systemic Lupus Erythematosus», *J. Immunol. Res.* 2016.
17. Bristeau-Leprince A, Mateo V, Lim A, et al. Human tcr $\{\alpha\}/\{\beta\}$ + cd4-cd8- double-negative t cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted v $\{\beta\}$ tcr diversity and are clonally related to cd8+ t cells. *J Immunol.* 2008.

18. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg M, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic fas mutations. *New England Medical Journal of Medicine*. 2004.
19. Yu GP, Chiang D, Song SJ, et al. Regulatory t cell dysfunction in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease. *Clinical Immunology*. 2009.
20. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014 Oct.

III. L'IMMUNOFENOTIPO NELLA SINDROME DA DEL22Q11

CONTRIBUTI PUBBLICATI SULL'ARGOMENTO DURANTE IL PHD

- I. Montin D, Marolda A, **Licciardi F** (corresponding author), Robasto F, Di Cesare S, Ricotti E, Ferro F, Scaioli G, Giancotta C, Amodio D, Conti F, Giardino G, Leonardi L, Ricci S, Volpi S, Baselli LA, Azzari C, Bossi G, Consolini R, Dellepiane RM, Duse M, Gattorno M, Martire B, Putti MC, Soresina A, Plebani A, Ramenghi U, Martino S, Pignata C, Cancrini C. *Immunophenotype Anomalies Predict the Development of Autoimmune Cytopenia in 22q11.2 Deletion Syndrome*. J Allergy Clin Immunol Pract. 2019 Sep-Oct;

La sindrome da delezione del cromosoma 22q11.2 (22q11.2DS) è una malattia genetica causata da una microdelezione in emizigosi sul braccio lungo del cromosoma 22. La sua prevalenza è stimata tra 1:2000 e 1:4000 nati, senza differenza tra maschi e femmine, rendendola la più comune sindrome da microdelezione nella specie umana.^{1,2,3} Nel 93% dei casi si tratta di una delezione *de novo*, mentre nella restante percentuale dei casi viene ereditata da un genitore con modalità di trasmissione autosomica dominante.⁴

Diversi studiosi nel corso degli anni hanno descritto tre quadri fenotipici di questa sindrome:

- la **Sindrome di DiGeorge**, descritta per la prima volta nel 1965, caratterizzata da dismorfismi faciali, malformazioni cardiache, ipoparatiroidismo e alterazioni dello sviluppo timico con conseguente immunodeficienza,
- la **Sindrome con anomalie facciali e tronco-conali (CTAFS)**, caratterizzata esclusivamente da facies caratteristica e cardiopatia congenita
- la **Sindrome velo-cardio-facciale (VCFS)**, caratterizzata da labiopalatoschisi, cardiopatia congenita e facies atipica.

La causa di tali quadri è rimasta sconosciuta fino al 1992 quando, in seguito a studi di citogenetica basati sull'ibridazione in situ FISH (*fluorescent in situ hybridization*), è stato possibile identificare nella maggior parte di questi pazienti una microdelezione del genoma in corrispondenza del braccio q del cromosoma 22; questo ha permesso di modificare la nomenclatura di queste sindromi unificandole sotto il termine "sindrome da delezione del cromosoma 22q11.2".⁵

Manifestazioni cliniche

La sindrome da delezione 22q11.2 può coinvolgere numerosi organi e apparati, presentando un'ampia eterogeneità con più di 190 manifestazioni cliniche descritte.²

Originariamente la definizione "classica" comprendeva:

- tetania ipocalcémica neonatale;
- immunodeficienza, prevalentemente a carico dell'immunità T-cellulare;
- alterazioni cardiache;
- dismorfismi faciali.

Tuttavia nell'arco degli anni ulteriori manifestazioni si sono dimostrate frequenti nei pazienti affetti da 22q11.2DS.

I **dismorfismi faciali** in questi pazienti sono un tratto caratteristico che si evidenzia prevalentemente durante l'infanzia. Nella *facies* caratteristica è presente a livello oculare ipertelorismo, epicanto, rima palpebrale stretta e diretta verso l'alto, la bocca risulta piccola e il naso lungo, stretto e bulboso alla punta; vi sono infine anomalie auricolari tra cui microtia ed impianto basso.

I **difetti congeniti cardiaci** sono la manifestazione clinica più comune, risultando anch'essi fondamentali nell'indirizzare la diagnosi. I difetti più frequenti sono la tetralogia di Fallot (20% dei pazienti), il difetto interventricolare (14%) e l'interruzione dell'arco aortico (13%).

Le **alterazioni otorinolaringoiatriche** sono molto frequenti e di vario genere. Le condizioni patologiche a carico del **palato** si riscontrano in circa il 69% dei pazienti e comprendono alterazioni di tipo funzionale e di tipo anatomico che vanno dall'insufficienza velo-faringea alla schisi sottomucosa alla labio-palatoschisi.

L'**ipocalcemia** è presente nel 50% circa dei casi ed è dovuta ad un'alterata funzione delle ghiandole paratiroidi. Essa è generalmente transitoria ed interessa il periodo neonatale, mentre tende a normalizzarsi con l'età nella maggior parte dei pazienti.

Non rare sono le **anomalie renali e delle vie urinarie** (l'agenesia o ipoplasia renale, l'ectopia renale, il rene displastico/multicistico, il rene a ferro di cavallo, la duplicazione renale e il megauetere) che interessano il 30% dei pazienti.

Le **anomalie neurologiche** di tipo anatomico non sono molto comuni, tuttavia sono frequenti i casi di pazienti affetti da **epilessia**, spesso farmaco-resistente e da **deficit cognitivo**. Il QI medio dei pazienti affetti da 22q11.2 DS è attorno a 70. Nell'età adulta non è raro lo sviluppo di malattia di Parkinson (PD) ad esordio giovanile, così come non è raro lo sviluppo di **disordini psichiatrici** (prevalenza del 25%) che includono la schizofrenia, il disturbo bipolare, i disturbi dell'umore e d'ansia.

L'IMMUNITÀ NELLA 22Q11.2 DS

La sindrome da delezione 22q11.2 è stata da sempre classificata come un'immunodeficienza T-cellulare, espressione della alterata funzionalità del timo che causa difetto di maturazione, proliferazione e selezione dei linfociti T. Tuttavia, recenti evidenze hanno dimostrato che, in aggiunta al difetto del comparto T-cellulare, nei pazienti con 22q11.2DS si riscontrano anche alterazioni del comparto B-cellulare^{6,7} e delle cellule NK⁸, suggerendo che il difetto immunologico non sia associato esclusivamente al difetto timico, ma presumibilmente anche ad un difetto intrinseco di sviluppo dei linfociti. L'entità del deficit immunitario comprende uno spettro variabile di alterazioni del numero e della funzionalità dei linfociti, che varia dalla quasi completa assenza di linfociti fino ad un quadro vicino alla normalità⁹.

La maggior parte dei pazienti con 22q11.2DS presenta una forma intermedia di immunodeficienza caratterizzata da un numero di cellule T lievemente diminuito con risposta proliferativa ai mitogeni pressoché normale⁹. Soltanto lo 0,5-1,5% dei pazienti presenta un'immunodeficienza T severa combinata (SCID), indicata con il termine di sindrome completa di DiGeorge (cSDG). Questi soggetti presentano un quadro di SCID T⁺B⁺ caratterizzato da linfopenia marcata, con quasi totale assenza dei linfociti T, mentre i linfociti B ed i linfociti NK sono generalmente presenti in numero normale o aumentato.

Dal punto di vista clinico le **infezioni ricorrenti** sono molto frequenti nei soggetti con 22q11.2DS, soprattutto a carico delle vie respiratorie. Soltanto una minoranza di pazienti presenta invece infezioni severe, con suscettibilità a patogeni tipici delle immunodeficienze di tipo T-cellulare, ovvero infezioni virali e candidosi sistemica. Raramente sono riportati casi di infezioni da microorganismi opportunisti oppure di sepsi; una tendenza all'ipogammaglobulinemia è descritta nei pazienti con 22q11.2DS ma solo una minoranza dei casi necessita di terapia sostitutiva con immunoglobuline⁷.

Come descritto in altre condizioni di immunodeficienza T-cellulare parziale, il difetto immunitario può estrinsecarsi in alcuni pazienti non come suscettibilità alle infezioni, quanto piuttosto con **manifestazioni autoimmuni**.

Le manifestazioni autoimmuni più frequentemente descritte sono la trombocitopenia immune (ITP) e l'anemia emolitica autoimmune (AIHA), seguite dall'artrite idiopatica

giovanile e dalla tiroidite autoimmune, meno comuni sono la neutropenia autoimmune e la vitiligine¹⁰.

Le manifestazioni di autoimmunità ematologica rivestono particolare interesse per il loro impatto sulla gestione clinica dei pazienti affetti da 22q11.2 DS. Pertanto, durante il dottorato, in collaborazione con altri centri della rete AIEOP, abbiamo condotto uno studio retrospettivo al fine di stimare l'incidenza di autoimmunità ematologica e valutare se questo peculiare fenotipo si sviluppasse in pazienti con anomalie caratteristiche all'immunofenotipo T e B linfocitario.

SEZIONE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI DELLO STUDIO

Per caratterizzare meglio le manifestazioni autoimmuni ematologiche nei pazienti affetti da 22q11.2 DS abbiamo utilizzato il database del Network italiano per le immunodeficienze primitive. Nel database sono stati registrati, dal 2006, i casi di 22q11.2 DS diagnosticata molecolarmente presso i 16 centri italiani di riferimento per la gestione della patologia.

All'interno del registro abbiamo selezionato tutti i pazienti con AIHA e/o ITP (gruppo HA) calcolando così la prevalenza di queste manifestazioni; successivamente, per valutare i fattori che condizionano l'insorgenza di autoimmunità ematologica nella 22q11.2 DS, abbiamo comparato il gruppo HA con un gruppo di controllo senza manifestazioni autoimmuni ematologiche (gruppo non-HA), selezionato casualmente con un rapporto di 1:2. I dati clinici e laboratoristici sono stati estrapolati dal registro e successivamente confermati dal centro di riferimento di ciascun paziente, aggiungendo inoltre i risultati degli immunofenotipi linfocitari eseguiti durante il *follow-up*.

Nello studio sono state analizzate, ove possibile, le seguenti popolazioni linfocitarie:

- *naïve helper T cells*: CD4⁺CD45RA⁺
- *activated memory helper T cells*: CD4⁺CD45R0⁺
- *circulating follicular helper T cells* (cTFHs): CD4⁺CD45R0⁺CXCR5⁺
- *regulatory T cells* (Treg): CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ (
- *Recent Thymic Emigrants* (RTEs): CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺
- *naïve cytotoxic T cells*: CD8⁺CD27⁺CD28⁺
- *transitional B cells*: CD38⁺⁺IgM⁺⁺
- *naïve B cells*: CD27⁻IgM⁺IgD⁺
- *IgM memory B cells*: CD27⁺IgM⁺IgD⁺
- *switched memory B* (SMB) cells: CD27⁺IgM⁻IgD⁻
- CD21Lo B cells: CD21^{low}CD38^{low}

Per valutare le differenze tra il gruppo HA e quello non-HA a livello immunofenotipico abbiamo dapprima comparato l'immunofenotipo all'ultimo follow-up, indi il primo immunofenotipo effettuato in occasione del riscontro della Del22q11.

In un secondo tempo, per ogni popolazione linfocitaria che risultava differente alla diagnosi tra i due gruppi, sono state calcolate le curve di Kaplan-Meier, per valutare se tali popolazioni linfocitarie fossero dei predittori utili dell'insorgenza di autoimmunità ematologica. I cut-off sono stati definiti utilizzando i valori comunemente accettati in letteratura per stratificare i pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile (CVID-la forma di immunodeficienza primitiva più frequente dell'età adolescenziale-adulta).^{11,12}.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando IBM SPSS Statistics 20.0 and GraphPad Prism 6.0. Le differenze tra i gruppi sono state calcolate utilizzando il Mann-Whitney *U* test per le variabili continue e il test esatto di Fisher per le variabili categoriche. La significatività statistica è stata posta a $P \leq 0.05$ per il confronto tra HA e non-HA; per le curve di sopravvivenza è stato utilizzato il test di Mantel-Cox con significatività posta a $P \leq 0.01$.

RISULTATI

Prevalenza della autoimmunità ematologica

A Gennaio 2018 nel registro IPINET si registravano 358 pazienti, dei quali 294 avevano dati relativi al follow-up. Globalmente il 24% della coorte (72/294) ha sviluppato una manifestazione autoimmune di qualsiasi tipo, l'8%(23/294) ha presentato autoimmunità ematologica; di questi 23 pazienti, 16 hanno sviluppato ITP, 2 AIHA, 5 entrambe (s. Evans); la mediana tra la diagnosi di 22q11.2 DS e l'esordio della prima manifestazione ematologica di 7.9 anni.

Il gruppo HA di 23 unità è stato comparato con un gruppo non-HA di 45. I pazienti HA avevano un'età significativamente maggiore (18.0 vs 14.0 anni, $p=0.015$) e avevano più frequentemente un'ipocalcemia persistente (45.4% vs 17.8%, $p=0.016$). Non sono emerse invece differenze per quanto concerne il coinvolgimento o meno di altri organi e apparati (rene, gastrointestino, cuore, alterazioni ORL, epilessia), né per quanto riguarda l'anatomia timica o la timectomia nel contesto di un intervento chirurgico. Inoltre non sono emerse differenze tra i due gruppi per quanto concerne l'incidenza di eventi infettivi (definiti come infezioni ricorrenti e/o infezioni gravi), o di altre manifestazioni autoimmuni (tiroidite, artrite, psoriasi).

I pazienti HA hanno specifiche alterazioni immunofenotipiche

L'immunofenotipo T e B linfocitario era disponibile in tutti i 68 pazienti arruolati.

A livello dell'immunofenotipo T non è presente nessuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per quanto concerne la conta CD4⁺. I pazienti del gruppo HA hanno una percentuale marcatamente ridotta di naïve CD4⁺ (26.8% vs 43.2%, $p=0.003$) e RTE (48.6% vs 80.5%, $p=0.046$); i CD4⁺ memory sono invece maggiori (74.0% vs 55.5%, $p=0.0013$). Non è stata trovata una differenza significativa tra i gruppi per quanto concerne i T citotossici naïve (41,4% vs 49,6%), le Treg (3.9% vs 5.9%), e i cTFHs (16.0% vs 13.5%) (Figura1).

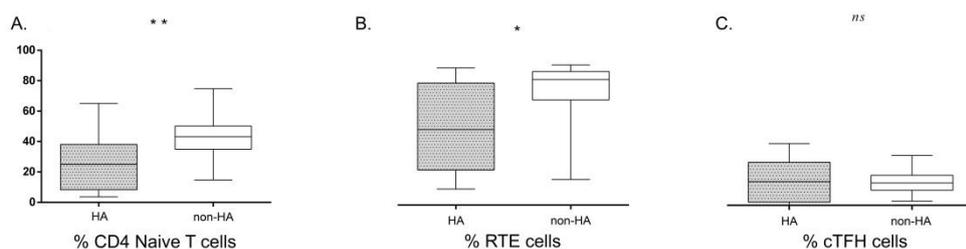


Figura1. Differenze all'immunofenotipo T tra i pazienti HA e quelli non-HA. Si segnala una riduzione significativa dei CD4 naive e degli RTE, non vi sono invece differenze a carico dei cTFH.

A livello dell'immunofenotipo B i pazienti HA presentano una riduzione significativa dei linfociti B switched memory (SMB) (2.0% vs 5.9% p=0.037), un aumento dei B naive (83.5% vs 71.4%, p=0,017) e dei CD21^{low} (9.9% vs 2.4%, p=0.018) (Figura2). Nessuna differenza è stata evidenziata per quanto concerne i B transitional (7.6% vs 9.4%) e le IgM Memory B cells (9.8% vs 8.3%).

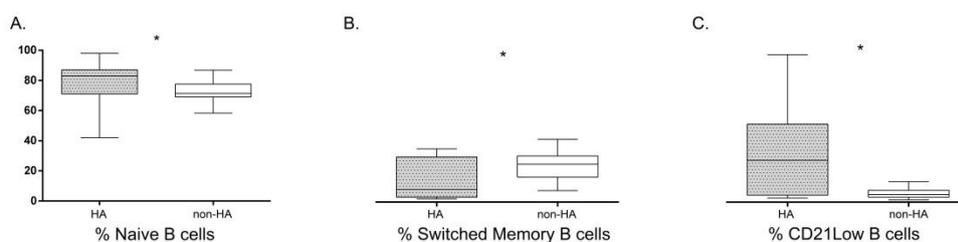


Figura2. Differenze all'immunofenotipo B tra i pazienti HA e quelli non-HA. Si segnala un incremento significativo dei linfociti B naive e dei CD21Lo nel gruppo HA, i linfociti SMB sono invece ridotti.

Infine, i pazienti non-HA presentano un incremento dei valori assoluti e percentuali dei linfociti NK CD3-CD16⁺/56⁺ circolanti (rispettivamente 312 vs 199 cells per microlitro, p=0.009 e 20.0% vs 13.0%, p=0,029) (Figura3).

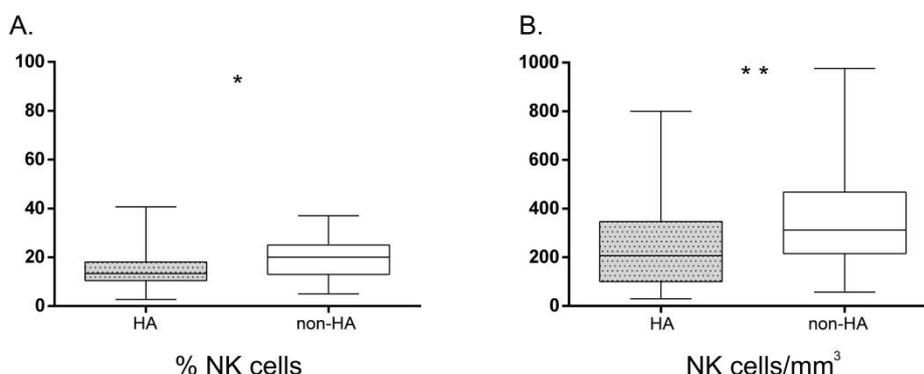


Figura3. Confronto tra gli NK CD3-CD16⁺/56⁺ nei pazienti HA e in quelli non-HA. Si segnala un aumento significativo sia in conta assoluta che percentuale nel gruppo non-HA.

I CD4⁺ Naïve e i B switched memory predicono lo sviluppo di HA nei pazienti con 22q11.2 DS

L'immunofenotipo (IFE) è stato effettuato alla diagnosi di 22q11.2 DS in 36 pazienti (11 HA e 25 non-HA), le età al primo IFE erano sovrapponibili tra i due gruppi.

I pazienti HA avevano una significativa riduzione dei CD4⁺ naïve (29.0% vs 51.0%, p=0.021) and riduzione degli SMB (1.7% vs 4.3% p=0.015); al momento della diagnosi non erano presenti differenze tra il numero e la percentuale di linfociti NK tra i 2 gruppi.

Basandoci sui cut-off utilizzati per la stratificazione dei pazienti affetti da CVID ($\leq 30\%$ per i CD4 naïve e $\leq 2\%$ per gli SMB) abbiamo calcolato il rischio relativo e l'odds ratio di sviluppare citopenia autoimmune nei pazienti. I pazienti con CD4 naïve $\leq 30\%$ hanno una OR di 14 e un RR di 6.9 volte; i pazienti con SMB $\leq 2\%$ hanno un OR di 44 e un RR di 9.6.

Abbiamo infine calcolato le curve di sopravvivenza per ciascuna delle due sottopopolazioni utilizzando i medesimi cut-off. Entrambe le curve hanno raggiunto la significatività statistica, rispettivamente $p=0,0001$ per i CD4⁺ naïve $\leq 30\%$ e $p=0.0018$ per le SMB $\leq 2\%$. (Figura4)

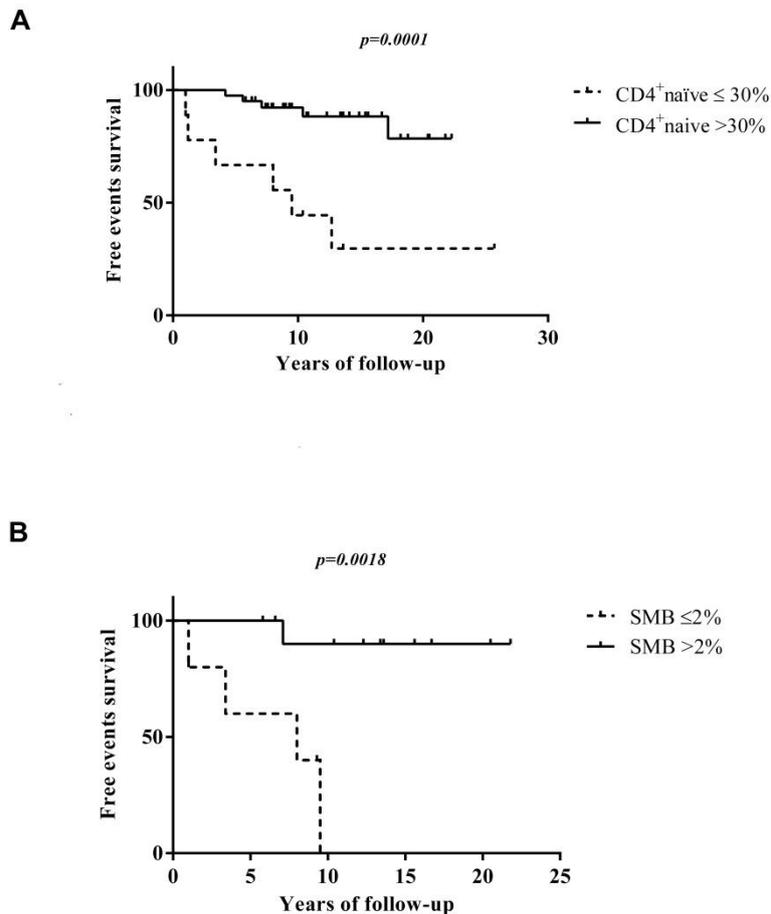


Figura4. Curve di sopravvivenza relative all'insorgenza di citopenia autoimmune nei pazienti affetti da 22q11.2 DS in base ai CD4 naïve e agli SMB alla diagnosi.

DISCUSSIONE

Nello studio abbiamo analizzato la più ampia coorte di pazienti con 22q11.2DS e autoimmunità ematologica pubblicata in letteratura. Il nostro lavoro, basato sui dati del registro italiano, ci ha permesso di evidenziare come l'8% dei bambini con 22q11DS abbia manifestazioni di autoimmunità ematologica. Dall'analisi delle caratteristiche cliniche e demografiche non sono emerse variabili in grado di predire lo sviluppo di queste complicanze, che solitamente compaiono 8 anni dopo la diagnosi di 22q11DS.

L'analisi dei dati al follow-up ci ha permesso di evidenziare specifiche alterazioni immunofenotipiche nei pazienti affetti da HA, in particolare abbiamo trovato una significativa riduzione dei linfociti CD45RA⁺ naïve e CD31⁺ RTE T helper cells, confermando alcune precedenti osservazioni^{10,13}.

I nostri risultati evidenziano come le alterazioni immunofenotipiche nei pazienti HA non siano confinate alle cellule T ma interessino anche altri linfociti, in particolare abbiamo osservato una riduzione significativa dei linfociti B switched memory (SMB) ed delle cellule NK.

La ridotta capacità di generare un repertorio adeguato di cellule SMB è un evento caratteristico di alcune PID, come per esempio l'immunodeficienza comune variabile. Lavori antecedenti al nostro avevano descritto, in una coorte di pazienti adulti con 22q11.2DS, una riduzione delle cellule SMB e una riduzione dell'ipermutazione somatica delle catene delle immunoglobuline ma tali riscontri non erano mai stati in precedenza associati ad uno specifico fenotipo clinico.^{7,14}

La riduzione delle cellule NK sia a livello percentuale che in termini assoluti è di indubbio interesse. Gli NK sono linfociti peculiari con uno sviluppo timo-indipendente e con funzioni riconducibili all'immunità innata. Precedenti studi hanno osservato - in alcuni pazienti con 22q11.2DS - alterazioni funzionali degli NK, sia per quanto concerne l'azione citolitica diretta, sia per la citotossicità cellulo mediata anticorpo dipendente⁸. I nostri dati sembrano in accordo con quanto precedentemente descritto e potrebbero suggerire un ruolo di *pathways* timo-indipendenti nella patogenesi dell'ITP e AIHA in pazienti con 22q11.2DS. Questa ipotesi di un difetto intrinseco di maturazione/attivazione del linfocita, a prescindere dallo sviluppo timico del paziente, dovrà essere approfondita in futuri studi.

L'aspetto più singolare del nostro lavoro è stata la scoperta che alcune alterazioni immunofenotipiche peculiari dei pazienti con HA in 22q11.2DS siano presenti già all'immunofenotipo eseguito alla diagnosi. Questi dati suggeriscono che l'HA sia una conseguenza dell'alterazione immunologica e non una causa.

In particolare le nostre analisi dimostrano come la riduzione dei CD4⁺ naïve e delle SMB siano presenti già alla diagnosi e siano forti predittori per lo sviluppo di autoimmunità ematologica in questi pazienti. In conclusione, nel contesto della 22q11DS, l'immunofenotipo può essere utilizzato dai clinici per stratificare i pazienti alla diagnosi per garantire un follow-up più personalizzato e permettere una diagnosi più precoce di ITP e AIHA. A questo scopo, nella pratica clinica, la percentuale di linfociti CD4 naïve (CD4⁺CD45RA⁺) rappresenta il parametro di più facile e immediato utilizzo, oltre ad essere maggiormente attendibile nei primi due anni di vita, quando la percentuale di SMB circolanti è fisiologicamente ridotta.

FUTURA EVOLUZIONE DEL PROGETTO

Nell'ultimo anno di dottorato il lavoro in questo ambito è proseguito in stretta collaborazione con i biologi del Dipartimento di Scienze Mediche, prof. Brusco (dott.ssa Elisa Giorgio). L'obiettivo del progetto, attualmente in corso, è quello di comprendere se lo sviluppo di HA nei pazienti con 22q11DS sia riconducibile alla presenza di varianti genetiche predisponenti.

Per effettuare tale analisi abbiamo sequenziato mediante *whole genome sequencing* (WGS) i pazienti costituenti la coorte di HA con fenotipo immunologico più grave (sia riduzione CD4 naive < 30% che SMB < 2%).

L'analisi dei risultati si concentrerà su:

- Valutazione di eventuali varianti in emizigosi nella porzione 22q11 del cromosoma non deletato. Tale analisi è atta a valutare l'ipotesi che la delezione smascheri varianti in geni recessivi.
- Valutazione di eventuali varianti a carico di un pannello di 400 geni associati ad immunodeficienza.
- Analisi dei break-point della delezione per valutare l'ipotesi che la delezione possa alterare la struttura della cromatina alterando l'espressione genica.

Ad oggi il WGS è stato eseguito in 8 pazienti. L'analisi dei risultati è attualmente in corso.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO

1. Lopez-Rivera, E. et al. Genetic Drivers of Kidney Defects in the DiGeorge Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2017.
2. Cancrini, C. et al. Clinical features and follow-up in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J. of Pediatr.* 2014
3. Hacıhamdioğlu, B. et al. 22Q11 Deletion Syndrome: Current Perspective. *Appl. Clin. Genet.* 2015.
4. McDonald-McGinn, D. et al. 22q11.2 Deletion Syndrome. *GeneReviews* 2013.
5. Associazione Immunodeficienze Primitive, Quaderni Sulle Immunodeficienze N.9. httpswww.aip-it.orgwp-content/uploads201704N09_2017.pdf.
6. Zemble, R. et al. Secondary Immunologic Consequences in Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome). *Clin. Immunol.* 2010.
7. Derfalvi, B. et al. B cell development in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Clin. Immunol.* 2016.
8. Zheng, P. et al. Molecular mechanisms of functional natural killer deficiency in patients with partial DiGeorge syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015.

9. McLean-Tooke, et al. Immunologic defects in 22q11.2 deletion syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008.
10. Tison, B. E. et al. Autoimmunity in a cohort of 130 pediatric patients with partial DiGeorge syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011
11. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111:77–85.
12. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2007..
13. Ricci S, Masini M, Valleriani C, Casini A, Cortimiglia M, Grisotto L, et al. Reduced frequency of peripheral CD4+CD45RA+CD31+ cells and autoimmunity phenomena in patients affected by Del22q11 syndrome. *Clin Immunol* 2018.
14. Klocperk A, Paračková Z, Bloomfield M, Rataj M, Pokorný J, Unger S, et al. Follicular Helper T Cells in DiGeorge Syndrome. *Front Immunol* 2018.

IV. L'IMMUNOFENOTIPO PER COMPRENDERE L'IMMUNOPATOGENESI DELLE NUOVE PID

CONTRIBUTI PUBBLICATI SULL'ARGOMENTO DURANTE IL PHD

- I. Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, ..., **Licciardi F**, ..., Aiuti A, Cancrini C, Di Matteo G. *Targeted NGS Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies*. Front Immunol. 2019 Apr 11;10:316. doi: 10.3389/fimmu.2019.00316. Erratum in: Front Immunol. 2019 May 31;
- II. De Leo P, Gazzarelli L, Baronio M, Montin D, Di Cesare S, Giancotta C, **Licciardi F**, Cancrini C, Aiuti A, Plebani A, Cicalese MP, Lougaris V, Foustieri G. *NFKB2 regulates human Tfh and Tfr pool formation and germinal center potential*. Clin Immunol. 2020 Jan
- III. Montin D, **Licciardi F**, Giorgio E, Ciolfi A, Pizzi S, Mussa A, Meazza R, Tartaglia M, Brusco A, Pende D, Ferrero GB. *Functional evaluation of natural killer cell cytotoxic activity in NFKB2-mutated patients*. Immunol Lett. 2018 Feb
- IV. Cicalese MP, Gerosa J, Baronio M, Montin D, **Licciardi F**, Soresina A, Dellepiane RM, Miano M, Baselli LA, Volpi S, Dufour C, Plebani A, Aiuti A, Lougaris V, Foustieri G. *Circulating Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells Are Severely Compromised in Human CD40 Deficiency: A Case Report*. Front Immunol. 2018 Aug

L'idea di fenotipizzare con precisione mediante citofluorimetria i linfociti nasce nei laboratori di ricerca come strumento potente e versatile per studiare le immunodeficienze, ma solo in un secondo momento il citofluorimetro si è dimostrato uno strumento indispensabile nell'inquadramento clinico delle immunodeficienze primitive¹.

Le immunodeficienze primitive sono un gruppo di patologie fenotipicamente e geneticamente eterogeneo. Nell'ultima decade la disponibilità su larga scala di potenti strumenti di analisi genetica (*whole exome e whole genome sequencing*) ha permesso la scoperta di un numero sempre crescente di geni in grado di causare malattia.

I progressi degli ultimi anni in ambito genetico stanno lentamente cambiando la caratterizzazione molecolare delle coorti di pazienti con PID, permettendo una più precisa definizione eziologica di quadri clinici complessi. Paradigmatico è l'esempio dell'immunodeficienza comune variabile (CVID).

La CVID comprende un gruppo eterogeneo di fenotipi clinici caratterizzati secondo la definizione ESID 2016 dalla contemporanea presenza, in assenza di cause secondarie di ipogammaglobulinemia, di ²:

- Marcata riduzione delle IgG e delle IgA con o senza riduzione delle IgM (<2 dev. Standard rispetto ai valori di riferimento per età)
- Scarsa risposta anticorpale specifica e/o valori bassi di B switched memory per età
- Età maggiore di 4 anni
- Assenza di difetto spiccato difetto T linfocitario
- Presenza di familiarità per CVID o almeno 1 delle seguenti condizioni cliniche: manifestazioni autoimmuni, manifestazioni granulomatosi, suscettibilità alle infezioni, linfoproliferazione policlonale non neoplastica.

Nella prima decade del millennio solo nel 5% dei casi di CVID venivano identificati geni causativi, ad oggi invece la percentuale di casi "risolti" da un punto di vista genetico è cresciuta in modo significativo, permettendo una migliore stratificazione dei pazienti³.

Durante gli anni di dottorato, un proficuo e continuo dialogo con i pediatri genetisti dell'OIRM mi ha permesso di partecipare ad alcuni progetti in collaborazione con i biologi del Dipartimento di Scienze Mediche della Salute e della Scienza di Torino, l'istituto scientifico San Raffaele di Milano e l'Ospedale Pediatrico Bambin Gesù di Roma volti a ottenere una diagnosi genetica precisa nei pazienti affetti da PID afferenti all'Immunologia dell'ospedale Regina Margherita. ^{4,5}

La somma di queste collaborazioni ha portato all'identificazione nella coorte di pazienti con CVID afferenti presso l'OIRM di 3 pazienti con mutazioni di CTLA4, 2 pazienti con mutazioni di NBAS, 1 paziente con una mutazione ipomorfica di RAG e 2 pazienti con mutazione con NFKB2.

La diagnosi di queste patologie estremamente rare ha avuto una duplice conseguenza: da un lato ha avuto una ripercussione tangibile sulla gestione clinica, dall'altro ci ha permesso di partecipare o coordinare studi volti a far luce sui meccanismi patogenetici di queste nuove immunodeficienze, come per esempio il deficit di NFKB2.

Il deficit di NFKB2

Nel 2013 il gruppo di Karin Chen di Salt Lake City identificò in una famiglia di pazienti affetti da ipogammaglobulinemia e insufficienza surrenalica una mutazione a carico del gene NF-kB2. NF-kB2 è un fattore di trascrizione strutturalmente simile a NF-kB. A differenza del suo più noto fratello che riveste un ruolo fondamentale nell'attivazione della maggior parte delle risposte infiammatorie dell'organismo, NF-kB2 svolge funzioni più specifiche, rivestendo per esempio un ruolo chiave nella maturazione linfocitaria B.⁶

Nel *paper* originale di Chen venivano descritti quattro casi di NF-kB2, in cui la patologia era causata da una aploinsufficienza di NF-kB2. Nei pazienti affetti, infatti, viene sintetizzata una forma tronca (a causa di uno stop codon prematuro) di NF-kB2 che, essendo priva di importanti siti di fosforilazione, rimane confinata a livello citosolico non potendo raggiungere il nucleo. Essendo NF-kB2 un fattore di trascrizione del linfocita B, i pazienti descritti da Chen presentano ipogammaglobulinemia e una riduzione dei linfociti B CD27+ (sia della zona marginal che switched memory).⁶

Nella coorte storica di pazienti affetti da CVID del Regina Margherita, tre pazienti, appartenenti a due diverse famiglie, hanno sviluppato insufficienza surrenalica in associazione a ipogammaglobulinemia. Il sequenziamento genetico di questi tre casi, effettuato presso l'Ospedale pediatrico Bambin Gesù, ha dimostrato - analogamente alla casistica di Chen - mutazioni in grado di determinare aploinsufficienza di NF-kB2.⁷

Questa piccola coorte di pazienti ci ha permesso in questi anni, in collaborazione con il laboratorio dell'ospedale San Raffaele e l'IRCCS San Martino di Genova, di analizzare le ripercussioni delle mutazioni di NF-kB2 sugli altri linfociti, in particolare i linfociti T follicolari e i linfociti NK.

I T FOLLICOLARI NEI PAZIENTI CON MUTAZIONI DI NF-kB2

Il centro germinale (GC) è un sito immunologico altamente specializzato, nel quale avviene l'interazione tra il linfocita T e il linfocita B, cui consegue una serie di processi quali lo switch isotipico (riarrangiamento della catena pesante delle immunoglobuline, che porta alla produzione di IgA, IgG, IgE), la maturazione dell'affinità anticorpale, la selezione e l'espansione di cloni B cellulari antigene-specifici; tali processi richiedono la cooperazione dei linfociti T helper (CD4⁺), i quali espongono sulla superficie cellulare molecole co-stimolatorie quali il CD40L.

Alcuni dati su modelli murini suggeriscono che NF-kB2 giochi un ruolo fondamentale non soltanto sulla maturazione del B, ma anche nella risposta T, rivestendo un ruolo rilevante nello sviluppo della tolleranza centrale.⁸

Per studiare le alterazioni della tolleranza centrale nei pazienti con mutazione di NF-kB2 è stata eseguita una tipizzazione dei linfociti T follicolari in 5 pazienti affetti da questa patologia (3 attualmente in follow-up presso l'OIRM, 2 reclutati in altre Immunologie italiane). Tutti i pazienti reclutati avevano la medesima mutazione (c.2557C>T, p.Arg853*). L'analisi citofluorimetrica, effettuata presso l'istituto San Raffaele di Milano, ha permesso di valutare i seguenti linfociti:

- CD4+Foxp3+: **T regolatorie**
- CD4+CXCR5+Foxp3+: **T follicular regolatorie (Tfr)**

- CD4+CXCR5+Foxp3⁻: **T helper follicular** (Tfh), queste sono state a loro volta divise in **Tfh1** (CCR6⁻ CXCR3⁺), **Tfh2** (CCR6⁻ CXCR3⁻) e **Tfh17** (CCR6⁺ CXCR3⁻) in base all'espressione o meno del CCR6 e CXCR3.

La distribuzione di tali popolazioni è stata confrontata con quelle di 29 donatori sani di pari età.

Dall'analisi statistica è emerso come i pazienti con mutazioni a carico di NF-κB2 abbiano una riduzione statisticamente significativa sia dei Treg circolanti ($p < 0.001$), che delle T follicular regolatorie ($p < 0.01$) (Figura 1). Questi dati evidenziano come NF-κB2 giochi un ruolo estremamente rilevante nella differenziazione dei Treg e delle Tfr, ruolo che potrebbe spiegare la particolare suscettibilità dei pazienti con questa patologia a sviluppare eventi autoimmuni.

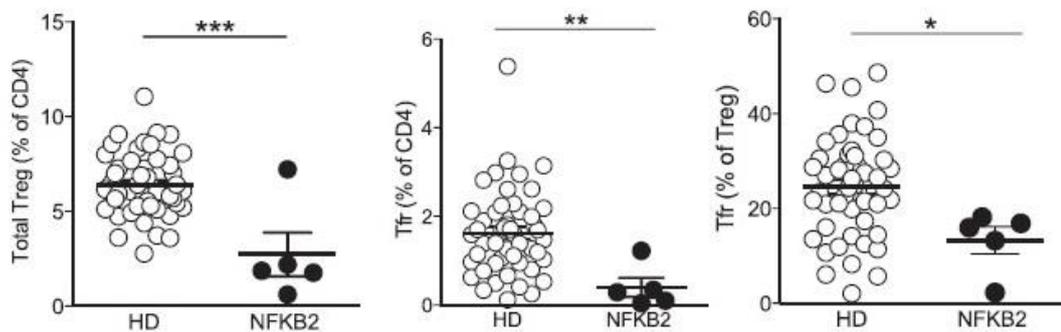


Figura 1. I linfociti Treg e Tfr nei pazienti con NF-κB2, differenze rispetto ai controlli sani. La percentuale di Treg è espressa come % dei CD4, quella dei Tfr sia come % dei CD4 che come % dei Treg.

L'analisi delle Tfh ha dimostrato una marcata riduzione di queste cellule negli NF-κB2 mutati ($p < 0.001$). L'analisi dei *subset* di Tfh ha dimostrato un alterato rapporto nei pazienti rispetto ai controlli, nella fattispecie un aumento percentuale dei Tfh2 ($p < 0.05$) e una riduzione dei Tfh17 ($p < 0.05$), (Figura 2).

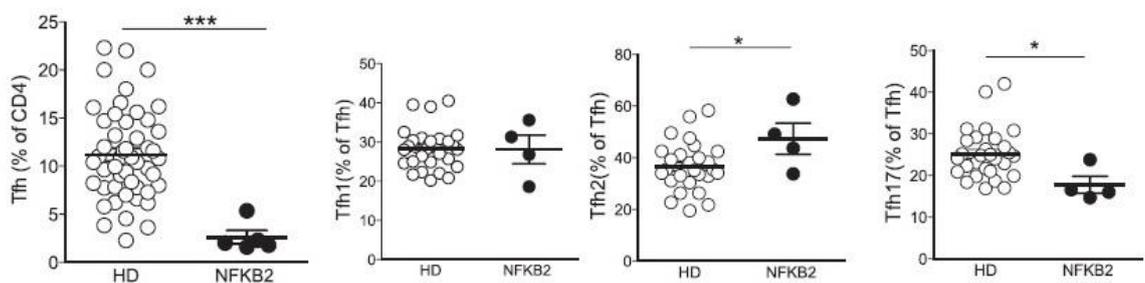


Figura 2. I linfociti Tfh e i loro subset nei pazienti con NF-κB2, differenze rispetto ai controlli sani. La percentuale di Tfh è espressa come % dei CD4, quella delle altre sottopopolazioni come % dei Tfh.

In conclusione, il nostro lavoro ha dimostrato come l'alterazione del pathway alternativo di NF-κB non determini esclusivamente alterazioni primitive del linfocita B, ma interessi anche popolazioni T linfocitarie fondamentali per sistema immunitario adattivo, quali i linfociti T reg e i linfociti T helper follicular⁹.

GLI NK NEI PAZIENTI CON MUTAZIONI DI NF-KB2

Fin dalla prima descrizione del difetto di NF- κ B2 è emerso come alcuni pazienti affetti avessero, oltre all'ipogammaglobulinemia e all'insufficienza surrenalica, un'aumentata suscettibilità a infezioni cutanee da virus a DNA (HSV e HPV) non invasive⁶.

È noto che la risposta alle infezioni virali si basa, per lo più, sulla adeguata funzione di linfociti non-B, come i linfociti T citotossici e i linfociti NK. Nel 2015 Lougaris et al. hanno investigato la funzionalità NK *in vitro* in un singolo paziente con mutazione (c.2557C>T, p.Arg853*) in NFKB2, dimostrando. Il paziente dimostrava una ridotta attività citotossica che non aumentava dopo esposizione a IL2. ¹⁰ Allo scopo di confermare le osservazioni dei colleghi bresciani e meglio chiarire l'effetto di NF- κ B2 sui linfociti NK, in collaborazione con il laboratorio di Immunologia dell'IRCCS AOU San Martino di Genova, abbiamo effettuato una approfondita valutazione di questa peculiare sottopopolazione linfocitaria nei tre pazienti con la medesima mutazione seguiti presso il nostro centro.

La conta NK è risultata normale in tutto il campione, così come l'espressione dei Natural Cytotoxic Receptors (NCR) NKp46 e NKp30 e l'espressione intracellulare della perforina e della SLAM-Associated Protein (SAP) (Figura3A); è stata inoltre testata la degranulazione sia in condizioni basali, sia dopo stimolazione con IL2: in tutti i casi la degranulazione è risultata sovrapponibile ai controlli sani (Figura3B). Infine, abbiamo testato la capacità di risposta degli NK in seguito ad attivazione di vari recettori: popolazioni di cellule NK policlonali sono state testate mediante il test di *reverse* citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (R-ADCC) contro bersagli murini marcati con cromo 51. Tutti i *pathway* studiati sono risultati funzionalmente sovrapponibili al controllo sano (Figura 3C).

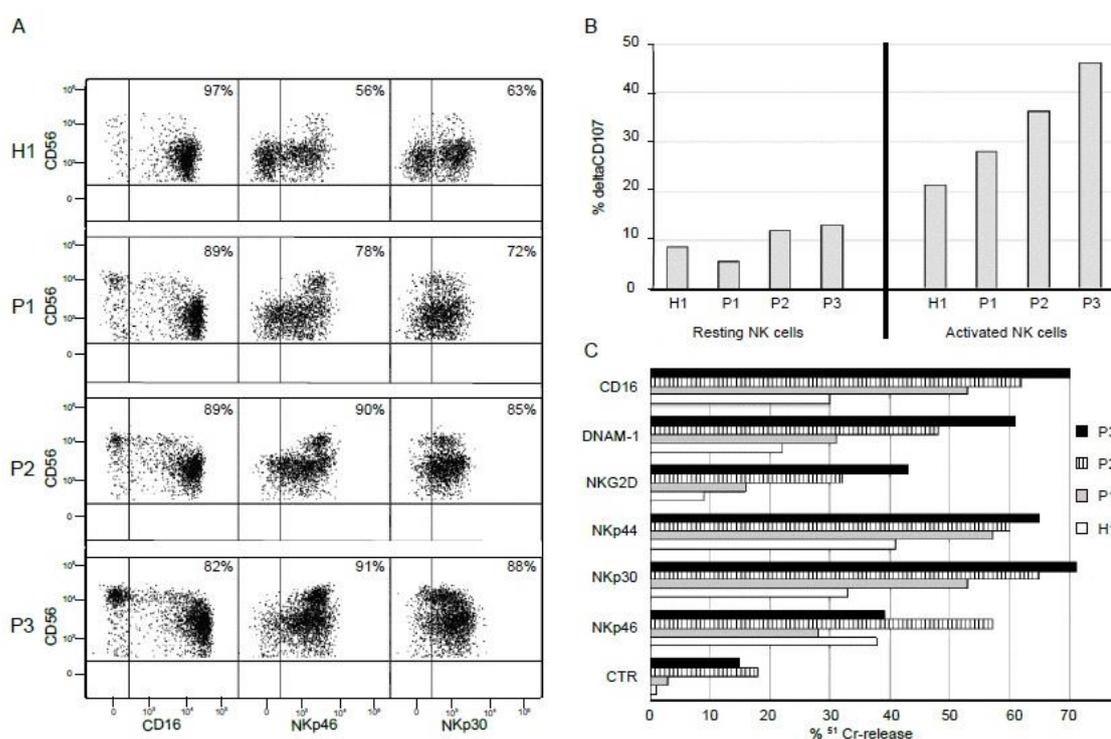


Figura3. La funzione NK e il loro fenotipo. **A.** Analisi citofluorimetrica dei tre pazienti e del controllo sano (H1). **B.** saggio di degranolazione degli NK stimolati e non stimolati con K562, i risultati sono percentuali di cellule Δ CD107+. **C.** le cellule NK policlonali attivate sono stati testate contro cellule target P815 Cromo marcate (E:T ratio 4:1) in assenza (CTR) in presenza di anticorpi monoclonali contro le mleccole indicate.

In sintesi, i nostri risultati dimostrano una fisiologica maturazione e attività citotossica in tre pazienti con mutazione c.2557C>T a carico di NF-kB2. Tale riscontro non conferma quanto precedentemente descritto da Lougaris et al. in un singolo paziente con la medesima mutazione. Si può pertanto ipotizzare che la mutazione di NF-kB2 non sia di per sé sufficiente ad alterare la funzione NK, e che le alterazioni precedentemente descritte in letteratura siano determinate da mutazioni a carico di altri geni modificanti.⁷

ALTRI PROGETTI

I LINFOCITI T FOLLICOLARI NEI DIFETTI DI SWITCH DI CLASSE

L'insostituibilità della citofluorimetria per lo studio della patogenesi di forme rare di PID è confermata da un'altra importante collaborazione portata avanti con i colleghi del San Raffaele di Milano in questi anni.

In questo progetto sono stati analizzati i linfociti T follicolari e T follicolari regolatori nei pazienti affetti da sindromi da Iper-IgM (HIGM). Le HIGM sono un gruppo di PID caratterizzate IgG e IgA basse o assenti e valori elevati di IgM. Ad oggi sono noti quattro difetti genetici in grado di causare questo quadro clinico:

- Il deficit di CD40L (MIM #308230), forma più frequente di HIGM a trasmissione X-linked
- Il deficit di activation-induced citidina deaminasi (AID) (MIM #605258)
- Il deficit di CD40 (MIM #606843)
- Il deficit di Uracil-DNA glicosidasi (UNG) (MIM #6081106)

Per descrivere le alterazioni dei linfociti T follicolari e T follicolari regolatori sono stati reclutati 6 pazienti affetti da CD40LG, 3 pazienti con mutazione di AID e 1 paziente con mutazione di CD40. Tutti i pazienti reclutati sono in follow-up presso una delle Immunologie Cliniche Pediatriche dei centri AIEOP. I risultati citofluorimetrici dei pazienti sono stati confrontati, vista la variabilità per età, con una popolazione di donatori sani pediatrici e adulti. Il protocollo di immunofenotipizzazione utilizzato è stato analogo a quanto precedentemente descritto nell'aploinsufficienza di NF-kB2.

In estrema sintesi i risultati hanno dimostrato quanto segue (Figura4):

- I pazienti con mutazioni a carico del CD40LG presentano una riduzione dei Tfh, dei Tfr e dei Treg rispetto ai controlli sani, il rapporto Tfh/Tfr è invece conservato.
- I pazienti con mutazioni di AID in età pediatrica presentano una distribuzione di tutte le popolazioni di T follicolari sovrapponibile ai controlli sani; si segnala un incremento marcato dei Tfh nell'unico paziente AID adulto.

- Il paziente con mutazione di CD40 presenta una compromissione molto marcata (superiore a quanto osservato nei CD40LG) di tutte le popolazioni follicolari, Tfh e Tfr.

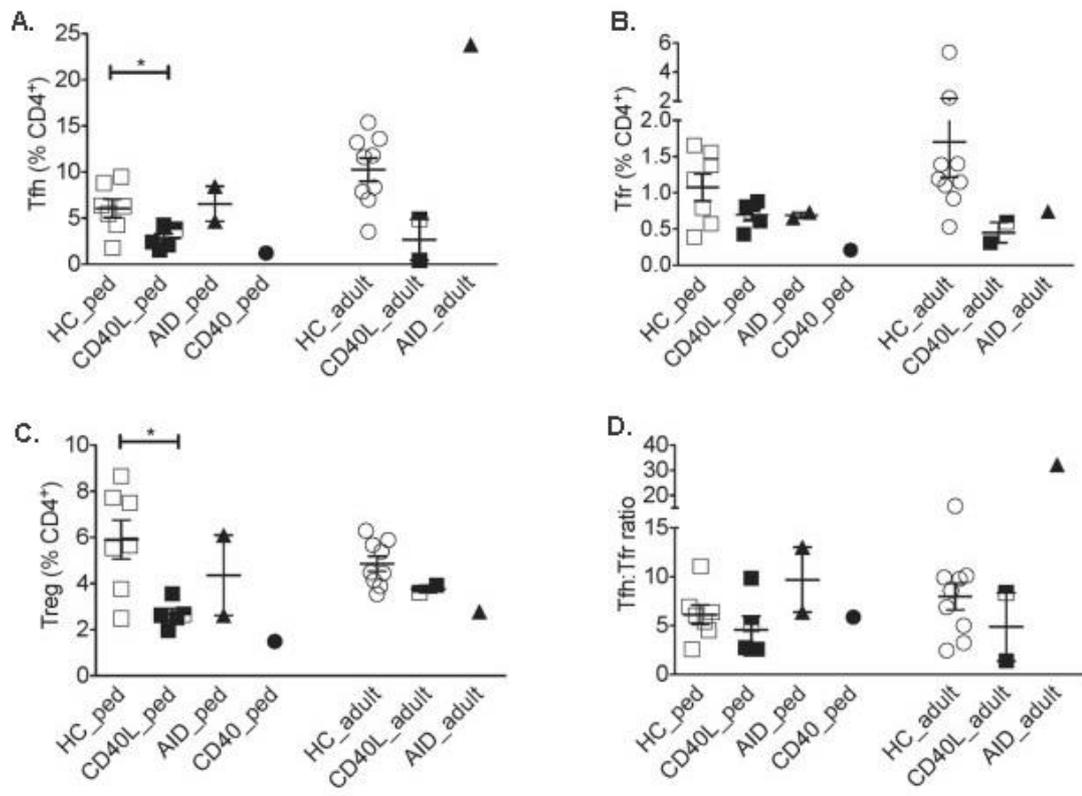


Figura4. . I linfociti Tfh, Tfr e Treg nei pazienti con HGM monogeniche, differenze rispetto ai controlli sani stratificati per età.

Pur necessitando di conferma in coorti più ampie, le presenti osservazioni sembrano suggerire che i pazienti con difetto di CD40 abbiano una compromissione più marcata della maturazione dei linfociti T follicolari. In effetti, CD40LG non è l'unico ligando di CD40 noto, è quindi verosimile che, nei pazienti con HGM X-linked, la sua funzione possa essere parzialmente vicariata da altri ligandi, quali il C3b, il C4b e il C4BP¹¹. Nei pazienti con mutazione di CD40, invece, l'attivazione della via di segnale non può verificarsi nemmeno in modo CD40LG e T-indipendente.

Per quanto riguarda i pazienti con deficit di AID, pare osservarsi negli anni un incremento progressivo delle cellule Tfh. Tale riscontro conferma precedenti osservazioni e suggerisce un tentativo compensatorio dei linfociti T; infatti, non essendo possibile la produzione di anticorpi ipermutati per effetto della mutazione sui linfociti B, si assiste a un incremento compensatorio della controparte T a livello del centro germinativo.¹²

1. Oliveira JB, Notarangelo LD, Fleisher TA. Applications of flow cytometry for the study of primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008
2. European Society for Immunodeficiencies, Common Variable immunodeficiency diagnosis criteria. <https://esid.org/Education/Common-Variable-Immunodeficiency-CVI-diagnosis-criteria>, 2016
3. Scharenberg A, Hannibal M, Torgerson T, Ochs H, Rawlings D. Common variable immune deficiency overview (genereviews). Seattle WA: University of Washington, Seattle; 2006.
4. Carli D, Giorgio E, Pantaleoni F, Bruselles A, Barresi S, et al. NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*. 2019 Jun.
5. Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, Zoccolillo M, Ferradini V, et al. Targeted NGS Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol*. 2019 Apr
6. Chen K, Coonrod EM, Kumánovics A, Franks ZF, Durtschi JD, et al. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF- κ B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet*. 2013 Nov
7. Montin D, Licciardi F, Giorgio E, Ciolfi A, Pizzi S, et al.. Functional evaluation of natural killer cell cytotoxic activity in NFKB2-mutated patients. *Immunol Lett*. 2018 Feb
8. Zhu M, Chin RK, Christiansen PA, Lo JC, Liu X, Ware C, Siebenlist U, Fu YX. NF- κ B2 is required for the establishment of central tolerance through an Aire-dependent pathway. *J Clin Invest*. 2006 Nov
9. De Leo P, Gazzurelli L, Baronio M, Montin D, Di Cesare S, et al. NFKB2 regulates human Tfh and Tfr pool formation and germinal center potential. *Clin Immunol*. 2020 Jan
10. Lougaris V, Tabellini G, Vitali M, Baronio M, Patrizi O, et al. Defective natural killer-cell cytotoxic activity in NFKB2-mutated CVID-like disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Jun.
11. Brodeur SR, Angelini F, Bacharier LB, Blom AM, Mizoguchi E, et al. C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity*. 2003 Jun
12. Cicalese MP, Gerosa J, Baronio M, Montin D, Licciardi F, et al. Circulating Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells Are Severely Compromised in Human CD40 Deficiency: A Case Report. *Front Immunol*. 2018 Aug

V. L'IMMUNOFENOTIPO SINOVIALE NELL'ARTRITE IDIOPATICA GIOVANILE

CONTRIBUTI PUBBLICATI SULL'ARGOMENTO DURANTE IL PHD

- I. **Licciardi F**, Ceci M, Toppino C, Turco M, Martino S, Ricotti E, Ferro F, Montin D. *Low synovial double negative T and $\gamma\delta$ T cells predict longer free-disease survival in oligoarticular JIA.* Cytometry B Clin Cytom. 2018 May

L'artrite idiopatica giovanile (AIG) è la causa più frequente di artrite cronica nei bambini, con una prevalenza stimata nella popolazione caucasica di circa 8,3/100000 abitanti^{1,2}.

L'AIG è attualmente una definizione ombrello nella quale vengono incluse una serie di forme diverse di artrite a probabile eziologia autoimmune che durino più di 6 settimane e che esordiscano prima dei 16 anni di età. L'artrite nell'AIG è cronica e non è imputabile ad altre cause identificabili quali patologie meccaniche di natura ortopedica, infezioni o altre patologie (oncologiche, metaboliche...)³.

Numerosi tentativi sono stati effettuati per cercare di classificare l'AIG e trovare categorie omogenee dal punto di vista eziopatogenetico, diagnostico e prognostico. La classificazione attualmente in vigore è stata proposta nel 1995 dall'ILAR⁴ e prevede 7 diverse categorie, definite sulla base di caratteristiche cliniche e laboratoristiche presenti nei 6 mesi che succedono l'esordio della malattia. Le categorie sono:

- Artrite ad esordio sistemico
- L'oligoartrite
- La poliartrite fattore reumatoide negativo
- La poliartrite fattore reumatoide positivo
- L'artrite psoriasica
- L'artrite entesite
- L'artrite indifferenziata

L'AIG oligoarticolare (oJIA) è la categoria di più frequente riscontro, essendo diagnosticata nel 50-80% degli esordi di AIG nei paesi industrializzati. Secondo i criteri ILAR un paziente è affetto da oJIA quando nel corso dei primi 6 mesi di malattia la patologia interessa 4 o meno articolazioni, vanno tuttavia esclusi i pazienti che sono affetti o hanno familiarità per psoriasi, hanno un parente di primo grado con HLA-B27, hanno il fattore reumatoide positivo o se la patologia è insorta in un paziente con più di 6 anni di età di sesso maschile⁴.

Risulta intuitivo alla lettura criteri quanto l'oJIA sia essa stessa una sottocategoria ombrello, all'interno della quale vengono inclusi pazienti con fenotipi estremamente variabili: includendo, al contempo, forme monoarticolari che necessitano esclusivamente terapia infiltrativa locale e forme con frequenti recidive e graduale coinvolgimento di più articolazioni.

Nelle ultime decadi l'incremento di opzioni terapeutiche efficaci ha migliorato significativamente l'outcome dei pazienti con oJIA, numerosi studi hanno fatto emergere però la necessità di una terapia precoce e aggressiva nei pazienti con decorso di malattia più severo. La stratificazione prognostica è diventata quindi uno degli aspetti cruciali nella definizione della corretta strategia terapeutica nei pazienti affetti da oJIA. Ad oggi sono disponibili modelli che si basano su caratteristiche demografiche, cliniche (sede articolare coinvolta) e laboratoristiche (positività ANA) ma la capacità di questi strumenti di predire l'outcome a lungo termine è ancora insufficiente⁵.

Un crescente numero di studi ha evidenziato, sia nell'adulto che nel bambino, come i linfociti sinoviali T e B siano fondamentali per sostenere il processo infiammatorio e determinare la cronicizzazione dell'artrite⁶⁻⁹.

Negli anni di dottorato ho quindi cercato di tipizzare sia a livello ematico che articolare i linfociti T e B nei pazienti affetti da oJIA al fine di far luce sul loro ruolo nella patogenesi e valutare se alcune sottopopolazioni avessero un ruolo prognostico.

SEZIONE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI DELLO STUDIO

Pazienti studiati

In questi anni abbiamo effettuato un'immunofenotipizzazione estesa T e B linfocitaria sia a livello ematico che sinoviale in pazienti sottoposti ad artrocentesi medicata affetti da oJIA, secondo i criteri ILAR⁴, afferenti al servizio di Reumatologia pediatrica OIRM.

In un primo momento abbiamo confrontato i fenotipi su sangue e sinoviale; indi abbiamo diviso i pazienti in 2 gruppi: nel gruppo A la fenotipizzazione è stata effettuata all'esordio di malattia (inteso come tempo tra diagnosi e infiltrazione inferiore a 4 settimane), nel gruppo B abbiamo effettuato la fenotipizzazione durante una infiltrazione per una recidiva di malattia. Abbiamo quindi confrontato i valori di linfociti sinoviali tra i 2 gruppi al fine di caratterizzare se i pazienti con una più prolungata storia di malattia avessero anomalie fenotipiche peculiari.

Infine per tutti i pazienti del gruppo A è stato effettuato un follow-up prolungato al fine di valutare l'andamento clinico in modo prospettico. Tutti i medici coinvolti nel follow-up non conoscevano i valori di immunofenotipo sinoviale del paziente alla diagnosi. Al fine di valutare se specifiche sottopopolazioni correlassero con un più severo decorso di malattia i pazienti recidivati del gruppo A sono stati confrontati con gli altri non recidivati del Gruppo A.

Processamento dei campioni e analisi citofluorimetrica

Le cellule sinoviali mononucleate (SFMC) sono state isolate da un campione di almeno 2 ml di liquido sinoviale (SF) ottenuto durante una procedura infiltrativa. Le cellule sono state separate mediante gradiente di densità, sottoposte a due lavaggi con abbondante SL:PBS con 0,1% BSA (Siero albumina Bovina) e 200 mM di EDTA (12 ml), e successivamente filtrate. L'analisi delle cellule mononucleate del sangue è stata condotta su campioni di sangue intero con EDTA.

Nello studio sono state analizzate, ove possibile, le seguenti popolazioni T linfocitarie:

- naïve helper T cells (NHT): CD4⁺CD45RA⁺
- activated/memory helper T cells (MHT): CD4⁺CD45R0⁺
- circulating follicular helper T cells (FHT): CD4⁺CD45R0⁺CXCR5⁺
- regulatory T cells (Treg): CD4⁺CD45R0⁺CD25^{high}CD127^{low}
- Recent Thymic Emigrants (RTEs): CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺
- naïve cytotoxic T cells (NCT): CD8⁺CD27⁺CD28⁺
- early effector cytotoxic T-cells (EECT): CD8⁺CD27⁺CD28⁻
- late effector cytotoxic T-cells (LECT): CD8⁺CD27⁻CD28⁻
- Double Negative T-cells (DNT): TCR alpha/beta⁺CD4⁻CD8⁻
- $\gamma\delta$ T cells (GDT): TCR alpha/beta⁻

E le seguenti popolazioni B linfocitarie:

- transitional B cells (Tr): CD38⁺⁺IgM⁺⁺
- naïve B cells (NFB): CD27⁻IgM⁺IgD⁺
- IgM memory B cells (MZB): CD27⁺IgM⁺IgD⁺
- switched memory B (SMB) cells: CD27⁺IgM⁻IgD⁻
- CD21Low B cells: CD21^{low}CD38^{low}

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando IBM SPSS Statistics 20.0 e GraphPad Prism 6.0. La differenza tra i gruppi è stata analizzata usando il test-U di Mann-Whitney per le variabili continue o il test χ^2 per le variabili categoriche. Le curve di sopravvivenza sono state comparate con il test di Kaplan-Meier. Tutti i test erano a 2 code, la significatività è stata posta a $p \leq 0.05$.

RISULTATI

I linfociti del liquido sinoviale hanno un aspetto attivato

Il liquido sinoviale e il sangue sono stati analizzati in 39 pazienti con oJIA.

A livello T linfocitario il liquido sinoviale è caratterizzato da un chiaro sbilanciamento in senso effettore con una riduzione degli NHT (5.77 vs 71.36% of CD3+CD4+) e un incremento degli MHT (76.44% vs 26.23% of CD3+CD4+), i CD8+ sono incrementati nella sinovia (28.33 vs 18.33% of CD3+) con una riduzione della componente naïve (50.37 vs 71.58% of CD3+CD8+); abbiamo riscontrato inoltre un incremento dei Treg (10.01 vs 2.66% of CD3+CD4+) e dei GDT (20.29 vs 10.58% of CD3+).

Anche a livello B linfocitario si segnala un incremento della percentuale di cellule attivate o esaurite in particolare sono incrementati i CD21low (34.96 vs 4.27% of CD19+) e le cellule SMB (34.25 vs 7.62% of CD19+), mentre sono ridotti i Tr (2.15 vs 8.22% of CD19+) e i NFB (27.24 vs 72.05% of CD19+).

I linfociti B nel SF dei pazienti in corso di recidiva hanno un fenotipo attivato

L'SF è stato ottenuto in 22 pazienti all'esordio (Gruppo A) e in 17 alla recidiva di malattia (Gruppo B). Il confronto tra le caratteristiche demografiche, cliniche e laboratoristiche dei pazienti è presentato nella Tabella 1.

Globalmente i pazienti del Gruppo B avevano un incremento significativo delle SMB nell'SF (58.53 vs 36.07% of CD19+, p-value 0.004) e una contestuale riduzione delle NFB (8.53 vs 25.9% of CD19+, p-value 0.002). Non sono state riscontrate differenze all'immunofenotipo T.

	GROUP A	GROUP B	p-value
DEMOGRAPHIC AND CLINICAL DATA AT BASELINE*			
N° of patients	22	17	
N° of female patients	68%	88%	0.25
Disease Activity (%)	82% moderate 18% high	6% low 82% moderate 12% high	
ANA positivity (%)	23%	24%	1.00
Age (Years, median and IQR)	4.10 (2.02 – 7.29)	6.14 (4.22 – 8.51)	0.08
N° of affected joints (median, IQR)	1.5 (1.0 – 2.0)	2.0 (1.0 – 3.0)	0.68
ESR (mm/h, median and IQR)	44.5 (20.8 - 86.3)	23.0 (12.0 – 39.0)	0.02
RCP (mg/l, median and IQR)	7.4 (1.6 - 23.08)	2.0 (0.6 – 2.5)	0.08
N° patients in Methotrexate therapy	0%	47%	
LYMPHOCYTES SUBSETS (% , median and IQR)			
CD3+ (of lymphocytes)	75.1 (65.8-87.5)	78.5 (76.4-85.8)	0.41
CD4+ (of T cells)	27.2 (23.1-32.1)	30.5 (23.7-35.5)	0.56
CD4+ memory (of CD4+)	95.7 (90.8-97.7)	96.7 (93.7-98.7)	0.14
CD4+ naïve (of CD4+)	2.1 (1.3-5.9)	1.5 (0.8-2.7)	0.08
DNT (of TCR αβ)	1.8 (1.5-2.5)	1.8 (1.5-3.4)	0.64
TCR γδ T cells (of T cells)	17.1 (15.1-24.6)	20.7 (13.1-31.1)	0.52
CD8+ (of T cells)	24.1 (15.9-35.4)	29.8 (17.3-37.2)	0.57
Tregs (CD4+CD45RO)	11.0 (5.6-14.6)	12.3 (9.5-16.9)	0.14
CD19+ (of lymphocytes)	2.6 (1.1-4.5)	1.2 (0.8-2.4)	0.10
CD19+ transitional (of CD19+)	1.8 (0.8-2.9)	1.0 (0.6-1.50)	0.06
CD19+ Naïve (of CD19+CD27-)	25.9 (14.7-33.9)	8.5 (5.9-16.1)	0.002
CD19+ class switched (of CD19+CD27+)	36.1 (28.2-54.6)	58.5 (46.9-64.9)	0.004

Tabella1. Differenze demografiche, cliniche, laboratoristiche e all'immunofenotipo tra il Gruppo A e il Gruppo B.

I SF dei pazienti con decorso recidivante hanno più DNT e GDT alla prima infiltrazione

In totale 13 pazienti (59%) del Gruppo A sono recidivati durante il follow-up, la durata mediana del follow-up è stata di 3 anni (35.6 mesi, IQR 24.7-49.9 mesi).

Dal confronto tra i pazienti del Gruppo A recidivati con quelli non recidivati è emerso come i primi avessero valori di DNT e GDT più alti nell'SF alla diagnosi, rispettivamente 2.38 vs 1.50% dei CD3+TCR alpha/beta+ (p-value 0.025) e 19.1 vs 15.0% dei CD3+ (p-value 0.004, Figura1); la quantità di GDT e DNT non correlavano l'uno con l'altro suggerendo che si trattava di 2 predittori indipendenti.

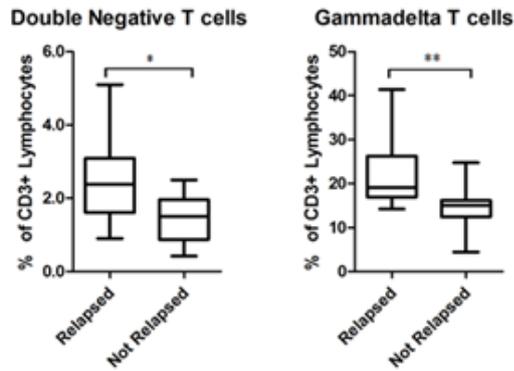


Figura1. Confronto tra i DNT e i GDT nei pazienti del gruppo recidivati e non recidivati.

Abbiamo infine cercato di stimare le curve di sopravvivenza utilizzando come evento indice la recidiva articolare. Il cut-off di DNT e GDT è stato calcolato stimando il punto di massima performance dell'esame utilizzando le curve ROC e l'indice di Youden. I cut-off sono stati posti a 1.8% per i DNT e a 16.0% per i GDT. Entrambe le curve di sopravvivenza (Kaplan-Meier) sono risultate statisticamente significative con un p-value=0.02 (Figura2)

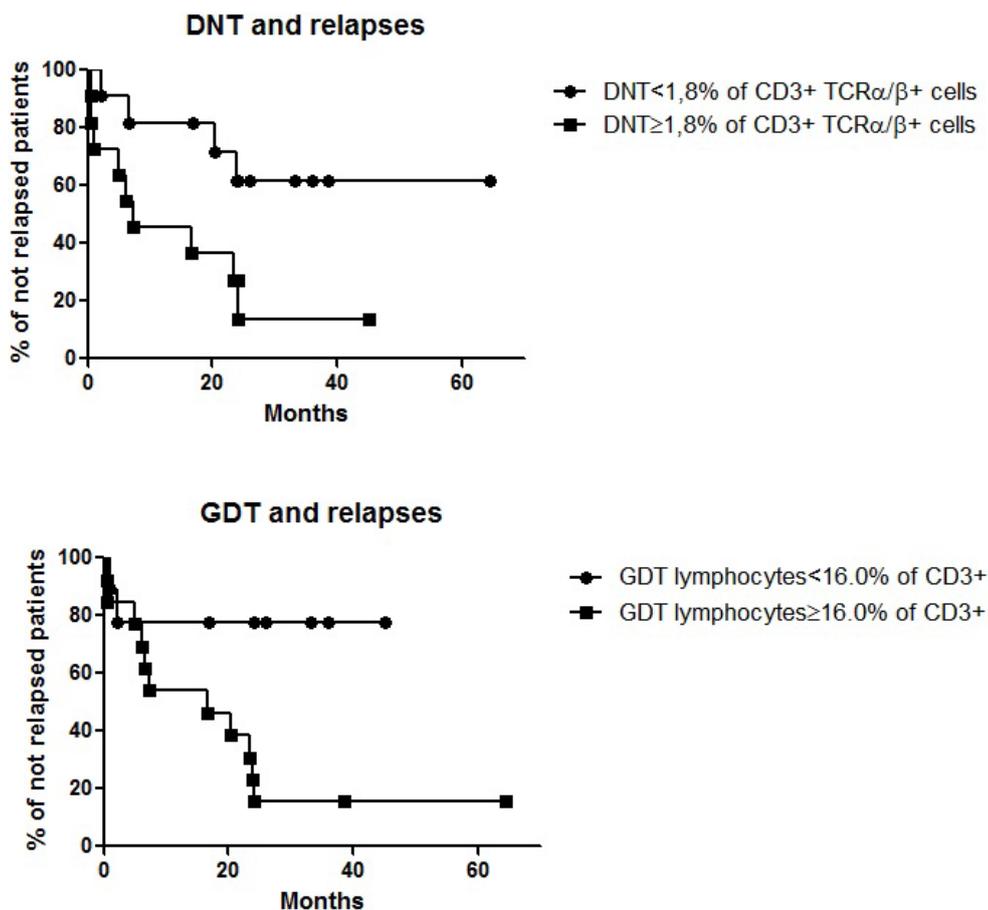


Figura2. Curve di Kaplan-Meier relative all'insorgenza di recidiva articolare nei pazienti con DNT ≥ 1.8% (riquadro alto) e GDT ≥ 16% (riquadro basso)

DISCUSSIONE

In questo studio, per primi, abbiamo effettuato una estesa fenotipizzazione dei linfociti T e B nella sinovia dei pazienti sottoposti a terapia infiltrativa al fine di stabilire il ruolo dell'immunofenotipo come marcatore prognostico.

Globalmente i linfociti T sinoviali, rispetto a quelli ematici, dimostrano un aumento dei CD8, dei linfociti T helper effettori e dei Treg; per quanto concerne il comparto B la maggior parte dei CD19+ sinoviali ha un fenotipo effettore con espressione del CD27. Questi dati confermano precedenti osservazioni⁷.

In un secondo momento abbiamo comparato i linfociti sinoviali all'esordio di malattia con quelli presenti alla recidiva; il confronto ha fatto emergere differenze spiccate solo per quanto concerne il comparto B linfocitario. Nel gruppo delle recidive (Gruppo B) abbiamo infatti trovato un numero considerevolmente superiore di SMB ($p=0.004$), tale dato suggerisce come nei pazienti con una storia prolungata di malattia avvenga un maturazione dei B linfociti in situ confermando quanto osservato da Corcione che ha evidenziato la presenza di microstrutture follicolari linfoidi nella sinovia infiammata dei bambini con AIG⁸.

Nell'ultima parte del nostro lavoro abbiamo diviso i pazienti del Gruppo A in 2 gruppi in base all'insorgenza di recidiva o meno durante il successivo follow-up, il confronto tra questi due sottogruppi ha fatto emergere un aumento dei DNT e dei GDT nei pazienti che sono successivamente recidivati.

I linfociti DNT sono una popolazione eterogenea di cellule T che, come suggerisce il nome, non esprimono né il CD4 né il CD8. La funzione di queste cellule è tuttora ignota, Voekli et al. hanno suggerito che queste cellule abbiano una potente azione di soppressione dell'attività CD4 e CD8 in modo Foxp3 indipendente¹⁰.

I GDT sono invece un piccolo sottogruppo di linfociti T che, come abbiamo ricordato nel capitolo 2, esprimono sul TCR le catene $\gamma\delta$ al posto delle usuali catene $\alpha\beta$. Anche in questo caso il ruolo che queste cellule hanno nel SF è oscuro, alcuni lavori suggeriscono che i GDT possono comportarsi da APC e possono promuovere l'attivazione B linfocitaria attraverso l'espressione del CD40L. Va sottolineato come i nostri risultati siano in accordo con quanto osservato da Wu et al. in modelli murini di artrite, nei quali i GDT sono incrementati a livello sinoviale e correlano con la gravità del quadro clinico¹¹.

Quale che sia il ruolo dei GDT e dei DNT nel liquido sinoviale i nostri dati pubblicati su *Cytometry* sembrano suggerire che i pazienti affetti da oJIA con DNT e GDT più elevati alla diagnosi siano a rischio di recidive precoci e necessitino quindi di un follow-up più stretto o addirittura di uno step-up terapeutico¹².

In conclusione anche in ambito reumatologico, analogamente a quanto avvenuto nella Del22q11, la citometria non si è rivelata solo un importante strumento per approfondire la comprensione della patogenesi dell'AIG ma si è rivelata un possibile predittore utilizzabile nella pratica clinica quotidiana.

EVOLUZIONE DEL PROGETTO

Lo studio prima descritto ha messo in luce il potenziale ruolo chiave nella AIG di alcune popolazioni linfocitarie sinoviali ad oggi poco studiate, i DNT e i GDT. Queste due peculiari popolazioni sono verosimilmente a cavallo tra l'immunità innata ed adattativa giocando un ruolo ora di stimolatori ora di soppressori dei T e dei B linfociti.

Negli ultimi anni, alla luce dei risultati precedenti, abbiamo cercato di portare avanti un progetto di fenotipizzazione più mirata dei DNT e dei GDT nei liquidi sinoviali dei pazienti con AIG all'esordio. Abbiamo quindi disegnato un protocollo mirato testando in ognuna delle due popolazioni l'espressione di antigeni di superficie quali il CD27, il CD28, CD62L e l'HLA-DR. La tipizzazione CD27/CD28 è stata effettuata in analogia al protocollo di fenotipizzazione dei T citotossici con i quali i DNT e i GDT condividono numerose caratteristiche. La molecola co-stimolatoria CD28 è una molecola espressa dai linfociti T la cui funzione è quella di contribuire alla loro attivazione in seguito al legame con molecole co-stimolatorie espresse dalle APC (CD80 e CD86). Il CD27 è una proteina recettoriale espressa sulla superficie delle cellule T che svolge la sua azione legando il CD70; tipicamente i T citotossici coesprimono nello stato di naive sia il CD28 che il CD27, indi perdono nell'attivazione dapprima il CD28 infine il CD27.

Il terzo marker studiato, il CD62L (chiamato anche L-selectina) è stato scelto in quanto molecola di adesione fondamentale del linfocita naive, la selectina permette l'ingresso della cellula negli organi linfonodali secondari attraverso le vene ad alto endotelio. Il quarto marker studiato l'HLA-DR è un antigene appartenente al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) umano ed è considerato un marker di attivazione tardiva dei linfociti T, compare dopo l'espressione in membrana del CD69 (fase molto precoce) e il CD25 (tardiva).

Ad oggi lo studio è attualmente in corso, sono stati arruolati 19 pazienti con AIG all'esordio. Le caratteristiche della popolazione finora reclutata sono descritte in Tabella2.

Numero di pazienti	19
Pazienti di sesso femminile	65%
Età media (anni)	5,8 (DS 3,75)
Tipo di AIG	Oligoarticolare 90% Artrite-entesite 5% Psoriasica 5%
ANA	ANA +: 26,3% ANA -: 73,7%

Tabella2. Caratteristiche della popolazione di pazienti con AIG all'esordio nella quale si è effettuata una estesa fenotipizzazione dei DNT e dei GDT.

RISULTATI PARZIALI

Fenotipizzazione dei DNT e dei GDT nel liquido sinoviale

Dall'analisi preliminare dei dati è emerso come la quasi totalità dei DNT esprima il CD27 (91.6%), il 63.9% dei DNT ha una coespressione del CD27 e del CD28. Per quanto riguarda invece il CD62L e l' HLA-DR i DNT esprimono alternativamente il CD62L o l'HLA-DR nei 2/3 dei casi. Nel 20,8% dei casi invece non esprimono né il CD62L né l'HLA-DR.

Analogamente ai DNT anche la maggior parte dei GDT esprime il CD27 (85%), solo un terzo dei casi coesprime però il CD27 e il CD28. L'HLA-DR nei GDT è poco espresso (13%), mentre il CD62L è espresso nel 40% dei casi.

Correlazione dei DNT e GDT con le caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti

Abbiamo cercato quindi di definire se alcune variabili (età, sesso, VES e PCR all'esordio, tempo intercorso tra esordio dei sintomi ed infiltrazione) influenzino i valori di DNT e GDT sinoviali. In questo ambito l'unica correlazione statisticamente significativa è risultata quella tra la latenza dell'infiltrazione rispetto all'esordio dei sintomi e i valori di DNT ($p=0,0003$, $R^2 0,5671$, Figura 3).

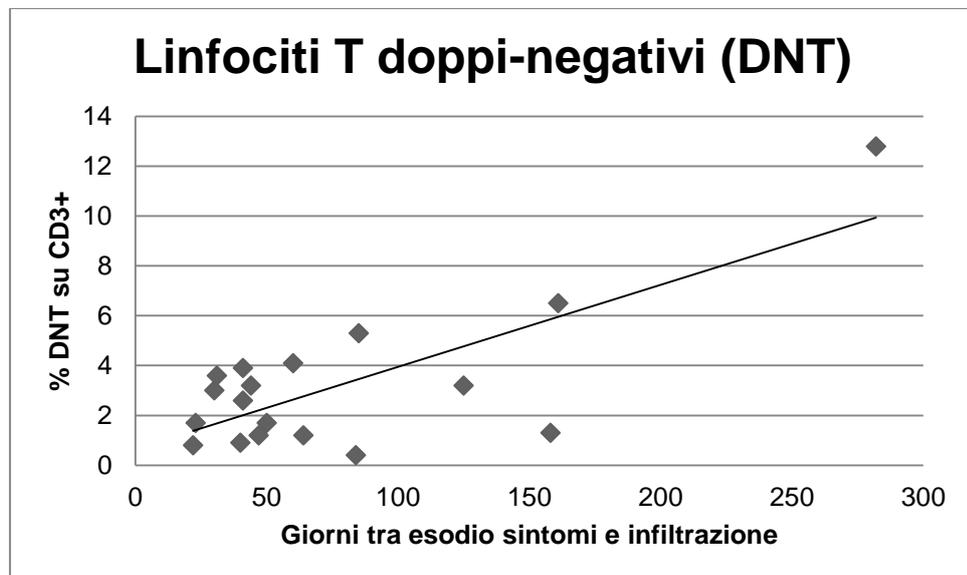


Figura3. Correlazione tra tempo intercorso tra esordio dei sintomi riferito e infiltrazione e valori di DNT sinoviali

Correlazione dei DNT e GDT con la recidiva entro i 100 giorni

Abbiamo infine testato se le recidive precoci (entro i 100giorni) fossero associate alla presenza di popolazioni DNT e GDT particolari. Ad oggi 18 pazienti analizzati hanno un follow-up superiore ai 100giorni.

Per quanto concerne i DNT i pazienti con recidiva precoce hanno un aumento dei DNT che esprimono il CD28 (85.8% vs 67.4%, $p=0.004$), in particolare risultano aumentate le

cellule che coesprimono il CD27 e il CD28 (71.5% vs 59.1%, $p=0.02$) mentre sono ridotte le CD27+ CD28- (11,6% vs 29.7%, $p=0.04$).

Per quanto riguarda invece i GDT si nota invece un aumento statisticamente significativo delle cellule esprimenti il CD28 (63,6% vs 30,1, $p= 0,003$) mentre risultano ridotti i GDT senza CD28, in particolare quelli CD27 positivi (30.6% vs 64.9%, $p= 0,007$).

Interpretazione preliminare dei risultati

I nostri dati preliminari suggeriscono che i DNT sinoviali nei pazienti affetti da AIG presentino per lo più un fenotipo HLA-DR-CD62L+CD27+CD28+; tale fenotipo suggerisce che si tratti di cellule naïve. In particolare la coespressione di CD27 e CD28 è tipica dei linfociti T naïve e central memory, mentre la progressiva perdita di tali marker si associa ad attivazione funzionale; la down-regolazione di CD28 è inoltre tipicamente associata a immunosenescenza¹³. Questa osservazione è inaspettata, in quanto la maggior parte dei linfociti DNT del sangue periferico, nei soggetti sani, presenta una ridotta o assente espressione di CD28¹⁴ e mostra le caratteristiche dei linfociti T terminalmente differenziati ed "esausti" che sono andati incontro a diversi cicli proliferativi, come dimostra il basso contenuto di T cell receptor excision circles (TREC) e l'espressione della molecola inibitoria PD-1¹⁵. Il fenotipo peculiare osservato nei DNT sinoviali ricorda quello descritto nei pazienti affetti da sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS)¹⁶, in questa patologia è noto come i DNT, a differenza di quanto avviene fisiologicamente, possono proliferare in risposta a stimolo antigenico¹⁷. Si può quindi ipotizzare che la presenza di linfociti DNT CD28+, possa rappresentare un reservoir di cellule a bassa soglia di attivazione, le cui capacità pro-infiammatorie potrebbe promuovere lo sviluppo della flogosi.

Sia per quanto riguarda i linfociti DNT che per i GDT, i pazienti con recidiva precoce presentano un aumento significativo della popolazione CD28+. Tale osservazione, in linea con quanto detto precedentemente, suggerisce un ruolo chiave di tale molecola co-stimolatoria nella patogenesi della flogosi articolare. Il CD28 promuove, inizia e mantiene l'attivazione linfocitaria tramite l'ingresso nel ciclo mitotico del linfociti, il rimodellamento del citoscheletro e l'aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie¹⁸. L'interazione tra CD28 e CD80/CD86 è il target del farmaco biologico Abatacept, una proteina di fusione formata dal frammento cristallizzabile (Fc) dell'immunoglobulina di classe IgG1 e il dominio extracellulare di CTLA-4. Abatacept si lega alle molecole CD80 e CD86 e impedisce l'interazione con CD28, senza la quale il linfocita T non può essere attivato. La presenza di una elevata percentuale di DNT e GDT esprimenti CD28 nel liquido sinoviale dei pazienti con forme più aggressive di AIG suggerisce la possibilità di un uso mirato di Abatacept in tali pazienti.

I nostri risultati dovranno essere confermati da una analisi al termine dello studio, ci prefiggiamo come obiettivo quello di arruolare almeno 40 pazienti con un un follow-up post-infiltrativo di almeno 100 giorni.

1. Ravelli and A. Martini, "Juvenile idiopathic arthritis," *Lancet*, 2007.
2. Petty R, Laxer R, Lindsley C, Wedderburn L. *Textbook of Pediatric Rheumatology*. Elsevier 2016
3. G. Giancane, A. Consolaro, S. Lanni, S. Davi`, B. Schiappapietra and A. Ravelli, "Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Treatment," *Rheumatol Ther*, 2016.
4. R. E. Petty, T. R. Southwood, P. Manners et al, "International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: 2nd revision," *J Rheumatol*, 2004.
5. E. H. P. van Dijkhuizen e N. M. Wulffraat, Early predictors of prognosis in juvenile idiopathic arthritis: a systematic literature review, *Ann. Rheum. Dis.* 2015.
6. E. H. Choy e G. S. Panayi, Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis, *N. Engl. J. Med.* 2001.
7. J. J. Goronzy e C. M. Weyand, Rheumatoid arthritis, *Immunol. Rev.* 2005.
8. A. Corcione et al., Phenotypic and functional characterization of switch memory B cells from patients with oligoarticular juvenile idiopathic arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, 2009.
9. A. M. Pesenacker e L. R. Wedderburn, T regulatory cells in childhood arthritis--novel insights, *Expert Rev. Mol. Med* 2013.
10. S. Voelkl, R. Gary, e A. Mackensen, «Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- double-negative T cells», *Eur. J. Immunol.*, 2011.
11. Wu, J. Yang, X. Li, e J. Chen, «The Role of $\gamma\delta$ T Cells in Systemic Lupus Erythematosus», *J. Immunol. Res.*, 2016.
12. Licciardi F, Ceci M, Toppino C, Turco M, Martino S, et al. Low synovial double negative T and $\gamma\delta$ T cells predict longer free-disease survival in oligoarticular JIA. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 May
13. Effros, R. B. & Walford, R. L. T cell cultures and the Hayflick limit. *Hum. Immunol.* 1984.
14. Voelkl, S. et al. Characterization of MHC class-I restricted TCR $\alpha\beta$ + CD4- CD8- double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009.
15. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 2015.
16. Bleesing, J. J. H. et al. A composite picture of TcR $\alpha\beta$ + CD4-CD8- T cells ($\alpha\beta$ -DNTCs) in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin. Immunol.* 2002.
17. Bristeau-Leprince, A. et al. Human TCR $\alpha\beta$ + CD4 - CD8 - Double-Negative T Cells in Patients with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Express Restricted V β TCR Diversity and Are Clonally Related to CD8 + T Cells *J. Immunol.* 2008
18. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. & Bluestone, J. A. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 2016.

VI. I FENOTIPI CLINICI INDOTTI DA SARS- CoV2 IN PEDIATRIA E IL LORO IMMUNOFENOTIPO

CONTRIBUTI PUBBLICATI SULL'ARGOMENTO DURANTE IL PHD

- I. **Licciardi F**, Giani T, Baldini L, Favalli EG, Caporali R, Cimaz R. *COVID-19 and what pediatric rheumatologists should know: a review from a highly affected country*. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2020 Apr 22;18(1):35. *pediatric rheumatologists should know: a review from a highly affected country*. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2020 Apr 22;18(1):35
- II. **Licciardi F**, Pruccoli G, Denina M, Parodi E, Taglietto M, Rosati S, Montin D. *SARS-CoV-2-Induced Kawasaki-Like Hyperinflammatory Syndrome: A Novel COVID Phenotype in Children*. *Pediatrics*. 2020 Aug
- III. Denina M, Pellegrino F, Morotti F, Coppo P, ..., **Licciardi F**. *All that glitters is not COVID: Low prevalence of seroconversion against SARS-CoV-2 in a pediatric cohort of patients with chilblain-like lesions*. *J Am Acad Dermatol*. 2020 Aug

L'ultimo anno di dottorato, il 2020, è stato segnato dal progressivo propagarsi a livello globale della pandemia dovuta all'infezione di un nuovo coronavirus, il SARS-CoV2¹. L'agente infettivo è stato scoperto in Cina nella provincia di Hubei a fine Dicembre 2019 e poi si è rapidamente diffuso in tutto il mondo. L'Italia è stata nella primavera 2020 una delle nazioni occidentali maggiormente colpite dall'epidemia².

L'avvento del SARS-CoV2 ha indubbiamente condizionato la ricerca a livello globale, tutta la comunità medico-scientifica ha infatti focalizzato la sua attenzione sul nuovo patogeno al fine di permettere rapidamente lo sviluppo di strategie diagnostiche e terapeutiche efficaci.

Il SARS-CoV2 è un patogeno che si diffonde per contatto e via droplets, l'infezione solitamente si verifica dopo un periodo di incubazione di 5 giorni, le manifestazioni cliniche vanno da forme lievi e asintomatiche a forme gravi e potenzialmente fatali². In ambito pediatrico la patologia acuta è sembrata fin dalle prime segnalazioni meno aggressiva con una letalità decisamente inferiore rispetto all'adulto³.

Nel corso della primavera 2020 alcuni autori hanno però osservato, nelle aree colpite dall'epidemia, un incremento significativo dell'incidenza di alcune manifestazioni cliniche peculiari, come per esempio i geloni e la Kawasaki shock syndrome. L'attività degli ultimi mesi di dottorato si è concentrata sullo studio di queste manifestazioni in pediatria nel tentativo di far luce sul nesso causale con il SARS-CoV2 investigando, tra l'altro, le caratteristiche immunofenotipiche di questi pazienti.

I GELONI E L'INFEZIONE DA SARS-COV2

Il SARS-COV2 viene tipicamente considerato un patogeno respiratorio, tuttavia non sono rare nel decorso della malattia le manifestazioni cutanee. Recalcati ha riportato interessamento cutaneo nel 20,4% dei pazienti adulti ricoverati per COVID, le più frequentemente osservate sono state il rash eritematoso (81.8%), l'orticaria diffusa (13,6%) e i rash vericelliformi (5,5%)⁴.

Nella primavera 2020 un numero crescente di pediatri in diverse nazioni del mondo ha notato un significativo incremento di lesioni da geloni (chilblains-like: CLL) nei bambini e negli adolescenti. Le CLL sono manifestazioni rare in pediatria e solitamente sono associate all'esposizione al freddo. Dal momento che i geloni sono stati segnalati in pazienti adulti in corso di infezione da SARS-Cov2, alcuni autori hanno suggerito che questa epidemia di CLL "fuori stagione" fosse riconducibile ad una manifestazione atipica secondaria all'infezione virale⁵. Il primo studio effettuato da Andina et al. in Spagna ha però fatto emergere come solo 1 paziente su 22 (5.3%) con CLL abbia un tampone positivo per SARS-CoV2⁶; alla luce di questi risultati durante questi mesi abbiamo testato un'ipotesi alternativa e cioè che i CLL fossero una manifestazione post-infettiva da SARS-CoV2.

MATERIALI E METODI

Per testare quest'ipotesi ho coordinato uno studio che ha coinvolto 4 ospedali piemontesi: l'ospedale Regina Margherita di Torino; l'ospedale Maggiore di Novara; l'ospedale SS. Antonio e Biagio di Alessandria e l'ospedale Castelli di Verbania.

Nello studio sono stati considerati potenzialmente reclutabili tutti i pazienti pediatrici con CLL esorditi in Piemonte nella primavera 2020. Dopo la segnalazione da parte dei pediatri di

base, i genitori dei pazienti venivano ricontattati per valutare se i pazienti soddisfacevano i seguenti criteri di arruolamento:

- Età <18 anni.
- Assenza di patologie cutanee cronica prima della comparsa dei CLL.
- Comparsa dei geloni tra l'8/3/20 e il 30/4/20.

Per ogni paziente veniva inoltre richiesto di inviare una documentazione iconografica (Figura1) delle lesioni al fine di escludere i pazienti senza CLL tipici.



Figura1. Alcune lesioni CLL dei pazienti reclutati nello studio.

In tutti i pazienti è stato somministrato, durante il contatto telefonico, un esteso questionario relativo alla storia clinica e ai dati epidemiologici del soggetto. Due settimane dopo la prima intervista telefonica i pazienti sono stati ricontatti per monitorare l'evoluzione del quadro e per programmare l'esecuzione del test sierologico.

I test sierologici sono stati eseguiti entro 30 giorni della comparsa dei CLL. I test sono stati effettuati con una doppia metodica: saggio alla chemoluminescenza (LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG, Diasorin; sensibilità riportata 97.4%) ed ELISA (In3diagnostic Eradikit COVID19-, sensibilità IgG 91.3% o EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 sensibilità delle IgG 100%); ove possibile è stato anche eseguito un tampone rettale o una ricerca mediante PCR del virus nelle feci.

Il giorno dell'esecuzione della sierologia il paziente è stato visitato da un pediatra esperto, inoltre è stato effettuato un ampio work-up diagnostico che ha incluso oltre ai classici esami della flogosi (VES e PCR) e della funzionalità epato-renale, il dosaggio delle immunoglobuline, del complemento, degli ANA e degli anticorpi della sindrome antifosfolipidi.

Per definire meglio le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con CLL (Chillblain Group) abbiamo confrontato questi pazienti con un gruppo di bambini affetti da infezione da SARS-CoV2 ricoverati presso l'ospedale Regina Margherita nello stesso lasso di tempo (COVID Group).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale, nel periodo di arruolamento, sono stati segnalati 42 casi dai pediatri territoriali, 35 pazienti soddisfacevano i criteri di inclusione, di questi 24 (68.6%) hanno accettato di effettuare i test sierologici.

L'età media dei soggetti reclutati era di 13 anni (IQR 6-17), con un rapporto femmine:maschi di 2:1. Le lesioni interessavano per lo più le dita dei piedi (92%), nell'8% coinvolgevano anche il tallone. In 6 pazienti le lesioni hanno avuto una evoluzione vescicolosa; nella maggior parte dei pazienti (83%) le lesioni sono durate più di 14 giorni.

In totale solo 3 pazienti (12.5%) sono risultati positivi ad entrambe le sierologie, un quarto paziente (4.1%) è risultato positivo all'ELISA ma negativo alla chemoluminescenza. Due di questi pazienti avevano avuto un contatto stretto con un familiare positivo a SARS-CoV2 e due avevano avuto sintomi tipici dell'infezione (anosmia). Un solo paziente è risultato positivo al tampone fecale (ed era contemporaneamente positivo ad entrambe le sierologie), la PCR fecale è risultata negativa in tutti i pazienti.

La tabella 1 mostra il confronto tra il Chillblain Group e i pazienti pediatrici ricoverati con infezione da SARS-CoV2. I pazienti con CLL hanno un'età significativamente maggiore, sono più frequentemente di sesso femminile, raramente accusano febbre e hanno una esposizione certa al SARS-CoV2 solo in una minoranza dei casi.

	Chillblains	SARS-COV2	P-value
Num. Patients	24	25	-
Age	13 (10,5-14)	3,8 (0,95-9)	p<0,0001
Female	62,50%	32,00%	p=0,04
Skin lesions	100%	12,00%	p<0,0001
Fever	16,70%	92%	p<0,0001
Cough	41,70%	52,00%	p=0,5
Conjunctivitis	12,50%	0,00%	p=0,1
GI symptoms	20,80%	25%	p=1
Certain Exposure to SARS-COV2	8,30%	56%	p=0,0006

Tabella1. Confronto tra pazienti con CLL e ricoverati per SARS-CoV2.

In sintesi la maggior parte dei pazienti con CLL della nostra casistica non ha una sieroconversione per SARS-CoV2 (83.3%). I nostri risultati sembrano suggerire che lo sviluppo di tali lesioni non sia direttamente imputabile ad un meccanismo post-infettivo

sconsigliando l'esecuzione di sierologia virale nei pazienti affetti da CLL qualora non si siano sviluppati sintomi di rilievo nelle settimane precedenti l'insorgenza delle lesioni o qualora non vi sia una documentata esposizione al virus⁷.

LA MULTI-INFLAMMATORY SYNDROME IN CHILDREN

A metà Aprile 2020, nel pieno dell'epidemia da SARS-CoV2 nella nostra regione, sono giunti all'ospedale Regina Margherita 2 pazienti affetti da un quadro clinico peculiare caratterizzato da febbre persistente, diarrea e segni di coinvolgimento muco-cutaneo Kawasaki-like. Nelle ore seguenti l'esordio i pazienti hanno sviluppato un quadro ipotensivo con marcata ipoalbuminemia, comparsa di leak capillare e infine scompenso cardiaco acuto (Figura2).

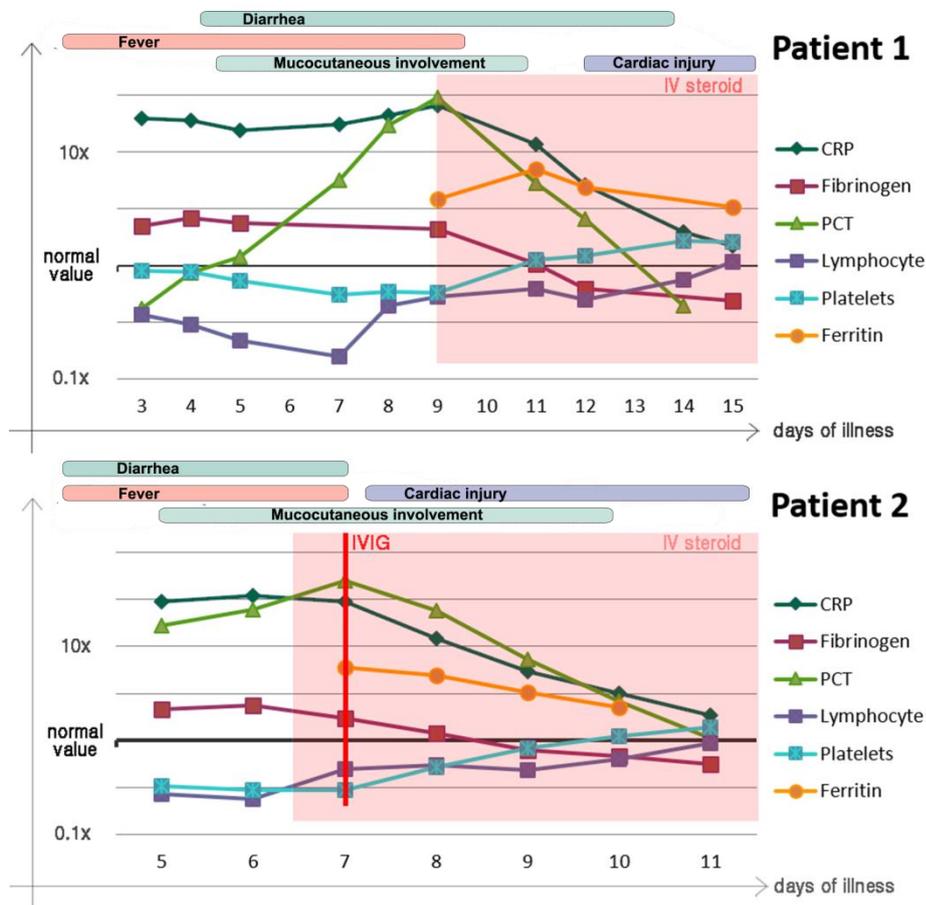


Figura2. Caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei primi pazienti affetti da MIS-C descritti su *Pediatrics*.

Entrambi i pazienti avevano PCR per SARS-CoV2 negativa ma elevati titoli anticorpali contro il virus. L'osservazione del peculiare fenotipo clinico associato a sieroconversione ci ha fatto supporre, in un articolo su *Pediatrics*, che ci trovassimo di fronte a una nuova entità nosologica caratterizzata dallo sviluppo di una patologia infiammatoria post-infettiva alla quale abbiamo dato, viste le analogie con la malattia di Kawasaki, il nome di SCiKH (SARS-CoV-2-induced Kawasaki-like hyperinflammatory syndrome)⁸. Le nostre osservazioni sono

state confermate da quanto osservato contemporaneamente da numerosi autori in tutto il mondo^{9,10}.

La nuova patologia ha ricevuto vari altri nomi tra cui PIMS-TS (Paediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with COVID-19) e MIS-C (Multi Inflammatory Syndrome in Children), quest'ultimo nome, benchè poco evocativo, è quello ad oggi più utilizzato in letteratura^{9,10}.

La MIS-C è una entità nosologica nuova che ha caratteristiche demografiche, cliniche e laboratoristiche diverse rispetto alla sindrome di Kawasaki classica¹¹. Uno dei punti interrogativi principali relativi a questa nuova sindrome è comprendere come mai l'infezione da SARS-CoV2 determini in alcuni pazienti una virosi acuta, in altri un quadro infiammatorio tardivo potenzialmente fatale.

Per far luce su questo ultimo aspetto, in questi mesi di dottorato, ho coordinato un progetto volto ad analizzare le differenze tra i linfociti B dei pazienti pediatrici affetti da MIS-C rispetto a quelli affetti da infezione acuta da SARS-CoV2.

MATERIALI E METODI

Tra Aprile e Luglio 2020 abbiamo effettuato una fenotipizzazione B estesa in 5 pazienti affetti da MIS-C (secondo le definizioni preliminari di caso definite dell'WHO)¹² e li abbiamo comparati con 8 bambini affetti da infezione acuta da SARS-CoV2 (COVID19) e 15 donatori sani age-matched (HD). Nei pazienti affetti da MIS-C e nel gruppo COVID19 i prelievi sono stati fatti entro 7 giorni dall'esordio dei sintomi (t0) e ripetuti dopo 4-6 settimane (t1).

I linfociti B sono stati così definiti:

- Transitional B cells (Tr): CD38⁺⁺IgM⁺⁺
- Naïve B cells (NFB): CD27⁻IgM⁺IgD⁺
- IgM memory B cells (MZB): CD27⁺IgM⁺IgD⁺
- Switched memory B (SMB) cells: CD27⁺IgM⁻IgD⁻
- Plasmablasti (PB): IgM-CD38⁺⁺⁺

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test Mann-Whitney per le variabili continue e il test esatto di Fisher per le variabili categoriche. Tutti i test sono stati effettuati a 2 code e la significatività è stata posta a $p \leq 0.05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le caratteristiche cliniche dei gruppi MIS-C e COVID-19 sono riassunte in Tabella2.

Al t0 i pazienti MIS-C hanno una percentuale incrementata di B circolanti (19.6%) rispetto sia ai HD (9.3%, $p=0.001$) che ai COVID (9.3%, $p=0.013$). Non vi è tuttavia una differenza significativa se si considera il numero assoluto di B linfociti.

Al t0 i pazienti MIS-C hanno meno TrB dei controlli sani (7,2% vs 10,7%, $p=0.01$); i pazienti COVID-19 invece hanno un incremento significativo, già al t0 dei PB sia rispetto ai pazienti MIS-C che agli HD. (Figura3)

Al t1 i pazienti MIS-C hanno rispetto agli HD una riduzione dei TrB (2.6% vs 10.7%, $p=0,001$), inoltre si evidenzia un incremento dei B maturi sia in termini di SMB (20.9% vs 9.3%, $p=0,04$), che di PB (2.7% vs 0.8%, $p=0,04$). (Figura3)

Abbiamo infine calcolato la variazione al t1 (Delta= % al t1 - % al t0) di ciascuna popolazione B linfocitaria sia nel gruppo COVID che nel gruppo MIS-C. Abbiamo osservato un aumento significativo dei B maturi (CD19+CD27+) nei pazienti MIS-C rispetto ai COVID (+13.1% vs +1.9%, p=0.008), tale incremento è principalmente imputabile ad un aumento delle SMB (+9.8% vs +1.7%, p=0.02) ed è accompagnato da una riduzione concomitante dei B naive (-13.0% vs -3.0%, p=0.003). (Figura3)

	COVID-19 (n=8)	MIS-C (n=5)
Sex	50% male	80.0% male
Age	11.0 (7.3-14.4)	8.3 (6.0-13.0)
Disease severity:		
• moderate	75.0%	0%
• severe	25.0%	20%
• critical	0%	80%
Clinical presentation:		
• Fever (>38°)	75.0%	
• Cough	37,5%	100%
• Pneumonia	25,0%	0%
• Gastro-intestinal	12,5%	80%
Increased pro-BNP	0.0%	80.0%
Hypotension	0.0%	80.0%
ICU admission	0.0%	20.0%
Positive PCR SARS-COV2 at disease onset	100%	20.0%
SARS-COV2 IgG	100%	100%
Treatment:		
Hydroxychloroquine	25.0%	0.0%
Azithromycin	37,5%	0,0%
IVIG	0,0%	40,0%
IV steroid	0,0%	100.0%

Tabella2: Caratteristiche demografiche, cliniche e terapia dei gruppi COVID-19 e MIS-C. La gravità di malattia è stata definita in base a Qiu et al.¹³

Globalmente i nostri risultati preliminari dimostrano marcate differenze nelle sottopopolazioni B linfocitarie tra i pazienti MIS-C e quelli con infezione acuta da COVID. L'aspetto indubbiamente più di rilievo è il raddoppio repentino delle SMB circolanti nei pazienti con MIS-C rispetto a quelli COVID, contemporaneamente si osserva una marcata riduzione dei TrB al t1. È interessante osservare come queste anomalie (incremento SMB e riduzione TrB) siano state descritte in pazienti adulti COVID ricoverati in terapia intensiva, questo dato sottolinea le analogie tra l'attivazione del sistema immunitario nei pazienti affetti da MIS-C e nei pazienti con COVID grave¹⁴.

Il ruolo di queste cellule B mature nelle MIS-C è oscuro. Recentemente la presenza di autoanticorpi è stata dimostrata nelle MIS-C, per tanto è ipotizzabile che questa proliferazione B linfocitaria possa cagionare un incremento di B autoreattivi¹⁵. Ulteriori studi e una fenotipizzazione più mirata di questi linfociti sarà fondamentale per chiarire il loro ruolo nella patogenesi della MIS-C.

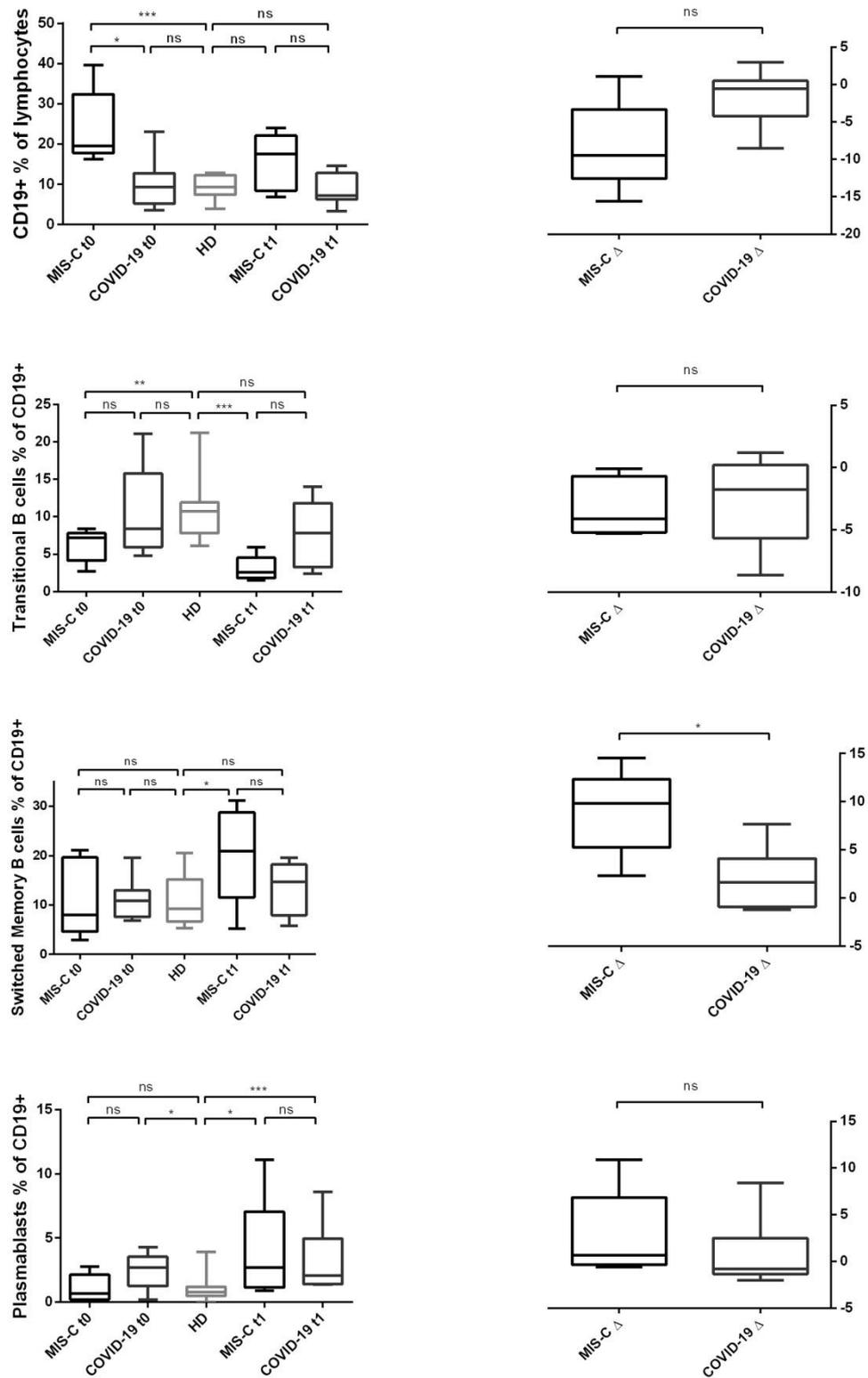


Figura3: a sinistra l'immunofenotipo al t0 e al t1 nelle MIS-C e nei pazienti pediatrici COVID-19 e il confronto con i controlli sani. A destra la variazione percentuale delle popolazioni B cellulari tra t1 e t0.

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020
2. Licciardi, F., Giani, T., Baldini, L. et al. COVID-19 and what pediatric rheumatologists should know: a review from a highly affected country. *Pediatr Rheumatol* (2020)
3. Castagnoli R, Votto M, Licari A, Brambilla I, Bruno R, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection in Children and Adolescents: A Systematic Review. *JAMA Pediatr.* 2020 Apr 22
4. Recalcati S. Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020
5. Piccolo V, Neri I, Filippeschi C, et al. Chilblain-like lesions during COVID-19 epidemic: a preliminary study on 63 patients [published online ahead of print, 2020 Apr 24]. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;
6. Andina D, Noguera-Morel L, Bascuas-Arribas M, et al. Chilblains in children in the setting of COVID-19 pandemic. *Pediatr Dermatol.* 2020
7. Denina M, Pellegrino F, Morotti F, Coppo P, Bonsignori IM, et al. All that glitters is not COVID: Low prevalence of seroconversion against SARS-CoV-2 in a pediatric cohort of patients with chilblain-like lesions. *J Am Acad Dermatol.* 2020
8. Licciardi F, Pruccoli G, Denina M, Parodi E, Taglietto M, et al. SARS-CoV-2-Induced Kawasaki-Like Hyperinflammatory Syndrome: A Novel COVID Phenotype in Children. *Pediatrics.* 2020 Aug
9. Belhadjer Z, Méot M, Bajolle F, et al. Acute heart failure in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) in the context of global SARS-CoV-2 pandemic [published online ahead of print, 2020 May 17]. *Circulation.*
10. Viner RM, Whittaker E. Kawasaki-like disease: emerging complication during the COVID-19 pandemic. *Lancet.* 2020
11. Whittaker E, Bamford A, Kenny J, Kaforou M, Jones CE, et al.; PIMS-TS Study Group and EUCLIDS and PERFORM Consortia. Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020 Jul.
12. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children and Adolescents with COVID-19 Scientific Brief 15 May 2020; Accessed September 27, 2020.
13. Qiu H, Wu J, Hong L, Luo Y, Song Q, et al. Clinical and epidemiological features of 36 children with COVID-19 in Zhejiang, China. *Lancet Infect Dis.* 2020.
14. Woodruff M, Ramonell R, Cashman K, et al. Dominant extrafollicular B cell responses in severe COVID-19 disease correlate with robust viral-specific antibody production but poor clinical outcomes. *medRxiv.* 2020
15. Gruber CN, Patel RS, Trachtman R, Lepow L, Amanat F, et al. Mapping Systemic Inflammation and Antibody Responses in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). *Cell.* 2020 Sep

VII. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

CONTRIBUTI PERSONALI CITATI NEL CAPITOLO

- I. **Licciardi F**, Scaioli G, Mulatero R, Marolda A, Delle Piane M, Martino S, Montin D, Tovo PA. *Epidemiologic Impact of the New Guidelines for the Diagnosis of Acute Rheumatic Fever.* J Pediatr. 2018 Jul

I dati fin qui esposti dimostrano come lo studio mediante citoflorimetro delle sottopopolazioni B e T linfocitarie possa essere uno strumento estremamente utile e versatile per studiare la risposta immunitaria dell'individuo nel corso dei più svariati processi patologici. I progetti portati avanti nel corso del dottorato mi hanno permesso di dimostrare come l'applicazione di questo strumento, nato in ambito immunologico, possa apportare indubbi vantaggi in tutte quelle patologie caratterizzate da una attivazione immunitaria verso un patogeno (come il SARS-CoV2) o verso il self (come nelle malattie reumatologiche).

Per un clinico come me, l'aspetto indubbiamente più affascinante dei lavori di questi anni è stata la scoperta che l'immunofenotipizzazione può avere, in alcuni ambiti, ripercussioni dirette sulla gestione clinica dei pazienti permettendo di disegnare follow-up e terapie più mirate. L'immunofenotipo in questa prospettiva va quindi a posizionarsi come un insostituibile strumento per una medicina sempre più precisa e personalizzata che non cura la malattia con protocolli rigidi ma li adatta in base alle caratteristiche immunologiche e metaboliche del soggetto.

Indubbiamente il traguardo di una medicina di precisione in grado di definire protocolli personalizzati in base alle caratteristiche immunofenotipiche dei pazienti è ancora lontano. Numerosi studi ed uno sforzo di standardizzazione globale delle metodiche, analogamente a quanto avviene in ambito oncoematologico, saranno fondamentali per permettere all'immunofenotipizzazione di diventare uno strumento utile nella pratica clinica quotidiana in ambito non-immunologico.

Dal punto di vista strettamente laboratoristico invece il futuro sarà rappresentato da metodiche integrate, in grado di associare la fenotipizzazione mediante citofluorimetro con le moderne tecniche di single-cell sequencing¹. Questo tipo di approccio integrato, attualmente impiegato soprattutto in ambito oncologico, potrebbe permettere di far luce su malattie reumatologiche la cui patogenesi risulta non del tutto compresa.

Una possibile applicazione di queste nuove metodiche potrebbe essere l'analisi approfondita del reperto TCR e BCR dei linfociti dei pazienti affetti da malattia reumatica.

La malattia reumatica (MR) è una patologia disimmune multisistemica che si sviluppa in alcuni bambini dopo un'infezione da Streptococco di gruppo A (SBEGA). Recentemente abbiamo dimostrato che la provincia di Torino sia un'area ad alta incidenza di malattia reumatica con un'incidenza di circa 3.2-9.6/100,000 casi-anno.²

La patogenesi della malattia reumatica è solo in parte compresa, il modello attuale prevede l'incontro di un soggetto predisposto con ceppi reumatogeni di SBEGA ma alcune osservazioni sembrano suggerire che sia quantomeno incompleto^{3,4}. L'applicazione dell'approccio single-cell potrebbe permettere di studiare a livello cellulare le caratteristiche dei TCR e BCR dei linfociti dei pazienti infettati da SBEGA facendo emergere le peculiarità di coloro che sviluppano MR; inoltre si potrebbero comparare le caratteristiche dei linfociti in base alle diverse manifestazioni cliniche di MR (corea, cardite, artrite...). Ulteriori applicazioni potrebbero per esempio essere ipotizzate nell'analisi dei linfociti sinoviali intra-articolari o per studiare le popolazioni di linfociti autoreattivi nella Del22q11.

1. Andreyev DS, Zybaylov BL. Integration of Flow Cytometry and Single Cell Sequencing. *Trends Biotechnol.* 2020 Feb
2. Licciardi F, Scaioli G, Mulatero R, Marolda A, Delle Piane M, et al. Epidemiologic Impact of the New Guidelines for the Diagnosis of Acute Rheumatic Fever. *J Pediatr.* 2018 Jul
3. Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet.* 2005 Jul
4. Bennett J, Moreland NJ, Oliver J, Crane J, Williamson DA, et al. Understanding group A streptococcal pharyngitis and skin infections as causes of rheumatic fever: protocol for a prospective disease incidence study. *BMC Infect Dis.* 2019