

sta elettronica è stato possibile organizzare gli accessi ed evitare ai pazienti inutili viaggi attraverso le strutture sanitarie.

L'ambulatorio della Lupus Clinic è stato condotto dalla dr.ssa Stefania Cartella nel primo semestre e dalla dr.ssa Micaela Fredi da Giugno. Durante tutto l'anno, hanno partecipato, a rotazione, anche diversi specialisti della Unità Operativa avvalendosi anche della collaborazione di specializzandi. Questi ultimi sono stati inseriti allo scopo di favorire la diffusione delle competenze in questa patologia tra giovani specialisti reumatologi allo scopo di aumentare la sensibilità della classe medica per questa malattia. L'interesse per il Lupus si è sviluppato anche in termini di studi effettuati nell'ambito sia della Cattedra di Reumatologia con tesi di laurea e di specialità che dell'attività clinica ospedaliera con osservazioni oggetto di comunicazioni a Congressi Nazionali (SIR) e Internazionali (CORA, EULAR, ACR) sia di pubblicazioni su riviste scientifiche. Questi studi includono anche i nostri dati relativi alla sicurezza e efficacia di nuovi trattamenti per il LES, anche infusivi.

Infine, anche quest'anno, nel mese di Ottobre (dedicato alla Campagna Internazionale di Sensibilizzazione della malattia LES, simboleggiato dalle piante di violette), ha avuto luogo un'iniziativa comune con la nostra associazione di pazienti (ABAR) ed i rappresentanti locali della Associazione Nazionale dei Pazienti con LES (signor Franco Frati).

Brescia, Dicembre 2015

*Dr. Franco Franceschini  
Responsabile della Lupus Clinic  
degli Spedali Civili di Brescia*

*Prof. Angela Tincani  
Direttore U.O.C. Reumatologia e Immunologia Clinica  
Spedali Civili e Università degli Studi di Brescia*

---

### **RICERCA 2013: BANDO SCADUTO IL 15 GIUGNO 2013**

---

***Finanziamento di un progetto sui diversi aspetti della malattia lupica dell'importo di 25.000 euro. Vincitore il dott. Jens Geginat di Milano.  
Rendiconto primo anno pubblicato su ICARO 73.***

### **Rendiconto dell'attività svolta nel secondo anno del progetto: "Ruolo dei linfociti T e B regolatori che secernono interleuchina-10 in pazienti con lupus."**

Nella prima parte di progetto, il nostro gruppo ha identificato una sottopopolazione di linfociti T CD4 in grado di regolare le risposte immunitarie B-mediate, che sono fenotipicamente e funzionalmente distinti dalle più "classiche" e ben caratterizzate T regolatorie (*Tregs*), che esprimono Foxp3 e CD25.

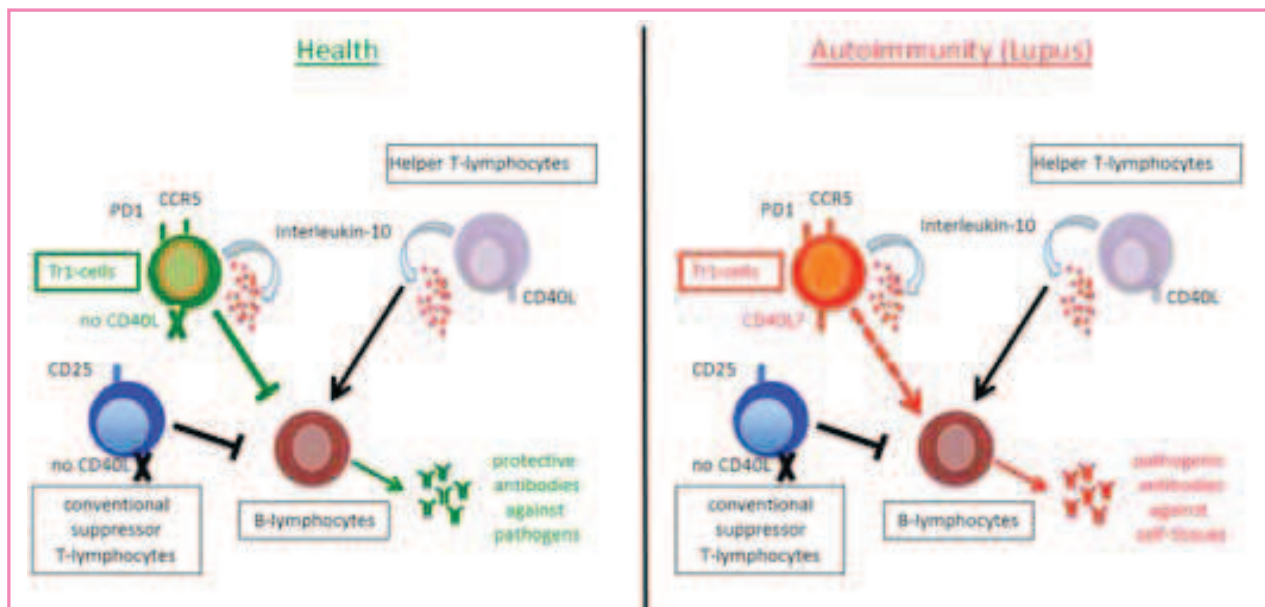
Tale sottopopolazione, definita Tr1, è identificabile nelle tonsille grazie ad una combinazione di marcatori fenotipici (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> IL7R<sup>-</sup> CCR5<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>) che la distingue dalle *Tregs* IL7R<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>, ed è caratterizzata dalla capacità di produrre elevati livelli di IL-10. Le Tr1 producono anche alti livelli di IL-21, citochina importante per l'attivazione dei linfociti B, ma risultano inefficaci nel sostenere la risposta B mediata, dal momento che

non esprimono il marcatore CD40L. Al contrario, le Tr1 sopprimono la produzione di IgG da parte dei linfociti B naïve, ma non sono in grado di bloccare la proliferazione dei linfociti B, né la produzione di IgM, mostrando quindi una specificità per la regolazione ed il controllo dello switch isotipico.

E' stato dimostrato che anche le Foxp3<sup>+</sup> Tregs tonsillari sono in grado di bloccare la produzione di IgG, ma a differenza delle Tr1, la loro attività soppressiva non può essere inibita dall'aggiunta di CD40L esogeno, suggerendo quindi che la capacità soppressiva delle Tregs sia più difficile da revertire rispetto a quella delle Tr1.

A dimostrazione di questa ipotesi, abbiamo evidenziato un accumulo di cellule Tr1 nel sangue periferico di pazienti affetti da lupus, che non solo hanno perso la loro capacità di sopprimere le risposte B mediate, ma in alcuni casi, sono addirittura in grado di fornire sostegno ai linfociti B. In netto contrasto, le Tregs degli stessi pazienti continuano a sopprimere la risposta B. Questi dati suggeriscono inoltre che le Tr1 possano giocare un ruolo critico nel lupus (figura 1) e sono stati pubblicati in riviste prestigiose quali "Journal of Allergy and Clinical Immunology" (Impact factor 11.48), e in "Atlas of Science" come "riassunto laico" con lo scopo di spiegare la rilevanza che tali scoperte hanno per i pazienti affetti da lupus ad un vasto pubblico.

La seconda parte del progetto è stata dedicata all'analisi del presunto ruolo patogenico di una seconda popolazione di linfociti CD4 che esprimono IL7R e CCR6, che secernono IL-10 (linfociti T IL10<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) e che sono però distinti sia dai linfociti T follicolari (Tfh) convenzionali (figura 1, report 1° anno), che dalle Tr1 sopra citate e descritte nel report del 1° anno (figura 2, report 1° anno). A differenza dei Tfh, tali linfociti sono accumulati nei pazienti con lupus, in particolare quelli con malattia in fase attiva.

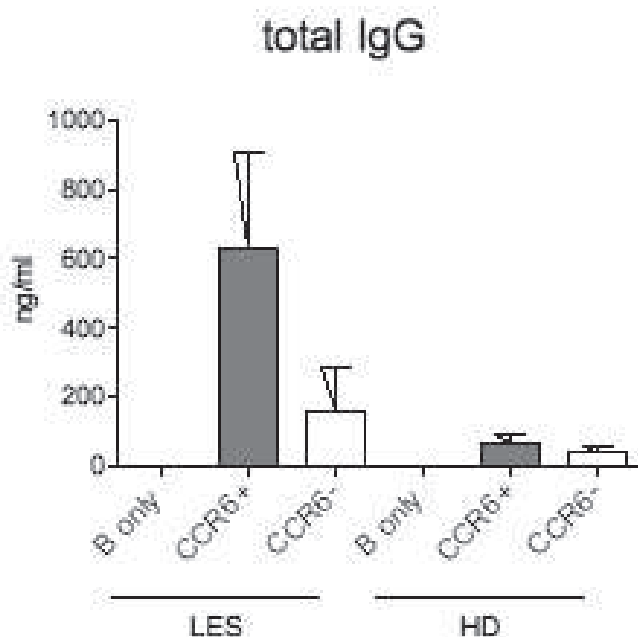


**Figura 1:** Modello proposto per l'effetto della perdita di funzione soppressiva delle cellule Tr1 e della conseguente produzione di auto-anticorpi in pazienti affetti da lupus. In individui sani, linfociti "helper" CD4 che esprimono CD40L e secernono IL-10, inducono la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B con funzione protettiva contro patogeni di varia natura (virus, batteri). L'azione congiunta di linfociti Tregs e Tr1 previene la produzione inappropriata di auto-anticorpi. In soggetti affetti da lupus, i linfociti Tr1 perdono la loro capacità soppressiva e contribuiscono invece alla produzione di auto-anticorpi. Poiché le cellule Tr1 producono IL-10 e possono acquisire l'espressione di CD40L, esse possono agire direttamente sui linfociti B fornendo loro sostegno (pubblicato il 10 novembre 2015 su Atlas of Science -<http://atlasofscience.org/a-functional-defect-of-t-lymphocytes-might-lead-to-disease-progression-in-lupus-autoimmune-patients/>).

In collaborazione con Richard Flavell alla Yale University, abbiamo potuto dimostrare che i linfociti T  $IL10^+CCR6^+$  sono presenti nella milza di topi non trattati, come avevamo già mostrato in soggetti umani in “Rivino et al., J. Exp. Med 2010”, e che tali cellule, se trasferite *in vivo* in topi recipienti, sono in grado di fornire un sostegno alla risposta B parzialmente mediato da IL-10, cosa che si evidenzia anche *in vitro*, ma non si verifica per i linfociti  $CCR6^-$  per i quali l’IL-10 non sembra giocare un ruolo fondamentale. Tali risultati sono stati ottenuti in topi in cui i linfociti B sono KO per il recettore dell’IL-10, dimostrando così che, in questo specifico setting sperimentale, la risposta indotta dall’IL-10 è importante nei linfociti B, ma non nei linfociti T.

Abbiamo inoltre potuto dimostrare che sebbene in generale anche i linfociti Th17 esprimano IL-10 e CCR6, essi rappresentano una popolazione ben distinta dai linfociti  $IL10^+CCR6^+$ , i quali non esprimono né IL-17, né ROR- $\gamma$ t nella milza di topi non trattati. Infine, in questa seconda parte di progetto abbiamo analizzato la capacità dei linfociti T  $IL10^+CCR6^+$  di fornire un sostegno spontaneo alla risposta B mediata in assenza di antigeni esogeni, situazione che caratterizza i pazienti affetti da lupus. Abbiamo potuto così constatare che i linfociti T  $IL10^+CCR6^+$ , ma non i linfociti  $CCR6^-$ , purificati da pazienti lupus, inducono una spontanea produzione di alti livelli di IgG da parte dei linfociti B degli stessi pazienti, cosa che non avviene in donatori sani. Sfortunatamente, nonostante gli alti livelli di IgG totali nelle co-culture autologhe T-B, non siamo stati finora in grado di analizzare i livelli di anti ds-DNA in pazienti lupus, poiché i mezzi che abbiamo tuttora a disposizione non sono sufficientemente sensibili, ma stiamo sviluppando nuovi sistemi per identificare questi anticorpi patogenici.

In conclusione, le nostre scoperte suggeriscono chiaramente che i linfociti T  $IL10^+CCR6^+$  sono una nuova popolazione di linfociti T in grado di sostenere l’attivazione dei linfociti B e di promuovere la produzione di auto-anticorpi in pazienti affetti da lupus, evidenziando il loro ruolo patogenico nella malattia. Tali risultati, che depongono a favore dell’utilizzo di terapie anti-IL10 nel lupus, saranno presto sottomessi per la pubblicazione in una prestigiosa rivista come “*The Journal of Experimental Medicine*”.



**Figura 2.** I linfociti T  $IL10^+CCR6^+$  inducono produzione spontanea di IgG da parte dei linfociti B in pazienti lupus.

Linfociti  $IL7R^+CD25^+CCR6^+$  o  $CCR6^-$  vengono purificati da sangue periferico di pazienti affetti da lupus e coltivati insieme a linfociti B autologhi in assenza di antigeni esogeni per 14 giorni. La produzione di IgG viene analizzata al termine della co-cultura mediante ELISA