

SCHEDA DI DINTESI DELLA TESI

New Therapeutic Targets in pediatric ITP – Nuovi Bersagli Terapeutici nell’Immuno Trombocitopenia Pediatrica

L’Immuno Trombocitopenia (ITP) è la piastrinopenia più frequente dell’età pediatrica, causata da una distruzione immuno-mediata delle piastrine e caratterizzata da una compromissione del sistema immunitario e del rilascio citochinico [1-4]. Le cellule mesenchimali stromali (MSC), note per le loro importanti proprietà antinfiammatorie ed immunomodulatorie, hanno un ruolo molto importante nell’eziologia di tale malattia [5-7]. In particolare, nei pazienti con ITP le MSC, sono fortemente compromesse. Nell’ITP a causa del non corretto funzionamento delle MSC, i linfociti T vanno incontro ad una notevole espansione clonale e ad un’alterazione del rilascio della citochina pro-infiammatoria TNF- α [8-10]. Recentemente è stato dimostrato che il recettore cannabinoide di tipo 2 (CB2), espresso principalmente dalle cellule del sistema immunitario, funziona da mediatore delle proprietà antinfiammatorie ed immuno-modulatorie delle MSC umane [11] e che la sua variante, Q63R, è associata a diverse patologie infiammatorie ed autoimmunitarie, come l’ITP [12].

Nei pazienti con ITP vi è inoltre un’alterazione del rapporto tra i linfociti T helper 1 (Th1) e quelli T helper 2 (Th2), con una prevalenza dei Th1 che stimolano i macrofagi e la fagocitosi piastrinica [4]. I macrofagi sono cellule fagocitiche con un ruolo chiave nei processi infiammatori. In base al fenotipo distinguiamo: i macrofagi attivati classicamente (M1) e quelli attivati in modo alternativo (M2) [13-15]. Gli M1 hanno funzioni pro-infiammatorie, anti-tumorali e anti-microbiche, rilasciando citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-6, IL-1 β and iNOS). Gli M2 mostrano proprietà antinfiammatorie ed immunosoppressive, rilasciando citochine antinfiammatorie (IL-10 e TGF- β), e hanno proprietà pro-angiogeniche e pro-fibrotiche, promuovendo la progressione tumorale [13-15]. Nell’ITP vi è una prevalenza del fenotipo M1, responsabile della compromissione sia dello stato infiammatorio che delle funzioni immuno-soppressive [13, 16, 17].

I corticosteroidi rappresentano le terapie di prima linea nell’ITP, ma a causa degli effetti collaterali ad essi associati non possono essere utilizzati come terapia di mantenimento continuativa. Il Prednisone è quello maggiormente utilizzato; tra gli altri corticosteroidi, anche il Desametasone (Dexa) ad alte dosi può essere utilizzato [18]. Nasce così l’esigenza di nuovi approcci terapeutici per la cura ed il miglioramento della qualità di vita di pazienti con ITP.

ELT è un agonista del recettore della trombopoietina, autorizzato per il trattamento dell’ITP cronica [19-21]. Promuove la produzione piastrinica e mostra proprietà immunomodulanti, riducendo la funzione dei Th e migliorando l’attività delle cellule T e B regolatorie [22, 23]. ELT potrebbe anche inibire l’attivazione dei macrofagi, determinando diminuzione della capacità fagocitaria e miglioramento del profilo infiammatorio [24]. Inoltre, ha proprietà ferro-chelanti [25, 26]. Il ferro è

coinvolto in diversi processi metabolici e la compromissione della sua omeostasi induce danno cellulare. I macrofagi hanno un ruolo importante nell'omeostasi del ferro: i macrofagi M1 internalizzano una maggiore quantità di ferro che comporta rilascio di citochine pro-infiammatorie e produzione di ROS, contribuendo allo stato infiammatorio [27].

Sulla base di queste evidenze, durante il mio primo anno di Dottorato abbiamo valutato gli effetti della stimolazione del recettore CB2 con il suo agonista selettivo JWH-133, insieme alla somministrazione di Dexa, sulla sopravvivenza delle MSC. Abbiamo dimostrato per la prima volta che la stimolazione di CB2 ripristina le proprietà immuno-soppressive ed antinfiammatorie delle ITP-MSC, suggerendo la possibilità di utilizzare Dexa in combinazione con un agonista di CB2 nel trattamento dell'ITP in maniera tale da ridurre la sua dose ed i suoi effetti collaterali pur mantenendone i benefici terapeutici [28].

Durante il secondo anno di Dottorato, abbiamo studiato il coinvolgimento dei macrofagi nell'alterazione della risposta immunitaria e dei processi infiammatori e gli effetti di ELT sulla polarizzazione macrofagica nell'ITP. Abbiamo dimostrato per la prima volta che ELT è in grado di mediare la polarizzazione macrofagica verso il fenotipo antinfiammatorio M2, suggerendo la possibilità di utilizzare ELT nel trattamento dell'ITP non solo per stimolare la produzione piastrinica, ma anche per ridurre lo stato infiammatorio e ripristinare le funzioni del sistema immunitario [29].

Infine, nel terzo anno di Dottorato abbiamo intrapreso un percorso di ricerca finalizzato a comprendere gli effetti di ELT sulle MSC ottenute da pazienti con ITP. Nelle ITP-MSC abbiamo osservato un aumento dei livelli di epcidina, un ormone coinvolto nella regolazione del metabolismo del ferro, i cui livelli aumentano all'aumentare dei livelli delle citochine pro-infiammatorie, in particolare dell'IL-6. La sua attivazione comporta la degradazione della ferroportina (FPN-1), unico esportatore del ferro [30-32]. Abbiamo, infatti, dimostrato che le ITP-MSC presentano un elevato contenuto di ferro intracellulare rispetto alle MSC CTR, responsabile della compromissione della funzionalità e della sopravvivenza delle MSC. In seguito al trattamento con ELT abbiamo osservato da un lato una riduzione dei livelli intracellulari di ferro, confermando le ben note proprietà ferro-chelanti di ELT, dall'altro una modulazione dei livelli di espressione proteica dei trasportatori del ferro. Per la prima volta, abbiamo dimostrato che ELT è in grado di ridurre la concentrazione di ferro intracellulare non solo attraverso la sua attività chelante, ma anche attraverso la sua capacità di modulare il metabolismo del ferro. In tal modo, riducendo la concentrazione del ferro intracellulare, ELT è in grado di ripristinare indirettamente la sopravvivenza e l'attività delle MSC, compromesse nell'ITP. Inoltre, ELT è in grado di promuovere la sopravvivenza ed impedire l'apoptosi delle MSC direttamente, modulando i livelli di espressione di proteine coinvolte in tali processi [33].

In conclusione, durante i tre anni di Dottorato la nostra ricerca è stata rivolta alla ricerca di nuovi target terapeutici per la cura ed il miglioramento della qualità di vita dei pazienti con ITP, valutando gli effetti di tali farmaci sull'attività di cellule che sono normalmente coinvolte nelle risposte infiammatoria ed immunitaria. Sicuramente, altri studi *in vitro* ed *in vivo* saranno necessari per validare i risultati ottenuti e per comprendere meglio i meccanismi d'azione di tali farmaci.

Bibliografia

1. Rodeghiero, F.; Stasi, R.; Gernsheimer, T.; Michel, M.; Provan, D.; Arnold, D. M.; Bussel, J. B.; Cines, D. B.; Chong, B. H.; Cooper, N.; Godeau, B.; Lechner, K.; Mazzucconi, M. G.; McMillan, R.; Sanz, M. A.; Imbach, P.; Blanchette, V.; Kuhne, T.; Ruggeri, M.; George, J. N., Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009, 113 (11), 2386-93.
2. Stasi, R.; Evangelista, M. L.; Stipa, E.; Buccisano, F.; Venditti, A.; Amadori, S., Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost* 2008, 99 (1), 4-13.
3. Swinkels, M.; Rijkers, M.; Voorberg, J.; Vidarsson, G.; Leebeek, F. W. G.; Jansen, A. J. G., Emerging Concepts in Immune Thrombocytopenia. *Front Immunol* 2018, 9, 880.
4. Wang, T.; Zhao, H.; Ren, H.; Guo, J.; Xu, M.; Yang, R.; Han, Z. C., Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2005, 90 (7), 914-23.
5. Gao, F.; Chiu, S. M.; Motan, D. A.; Zhang, Z.; Chen, L.; Ji, H. L.; Tse, H. F.; Fu, Q. L.; Lian, Q., Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016, 7, e2062.
6. Rosado, M. M.; Bernardo, M. E.; Scarsella, M.; Conforti, A.; Giorda, E.; Biagini, S.; Cascioli, S.; Rossi, F.; Guzzo, I.; Vivarelli, M.; Dello Strologo, L.; Emma, F.; Locatelli, F.; Carsetti, R., Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev* 2015, 24 (1), 93-103.
7. Starc, N.; Ingo, D.; Conforti, A.; Rossella, V.; Tomao, L.; Pitisci, A.; De Mattia, F.; Brigida, I.; Algeri, M.; Montanari, M.; Palumbo, G.; Merli, P.; Rossi, P.; Aiuti, A.; Locatelli, F.; Bernardo, M. E., Biological and functional characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients affected by primary immunodeficiency. *Sci Rep* 2017, 7 (1), 8153.
8. Perez-Simon, J. A.; Tabera, S.; Sarasquete, M. E.; Diez-Campelo, M.; Canchado, J.; Sanchez-Abarca, L. I.; Blanco, B.; Alberca, I.; Herrero-Sanchez, C.; Canizo, C.; San Miguel, J. F., Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Cytotherapy* 2009, 11 (6), 698-705.

9. Zhang, J. M.; Feng, F. E.; Wang, Q. M.; Zhu, X. L.; Fu, H. X.; Xu, L. P.; Liu, K. Y.; Huang, X. J.; Zhang, X. H., Platelet-Derived Growth Factor-BB Protects Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Derived From Immune Thrombocytopenia Patients Against Apoptosis and Senescence and Maintains MSC-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med* 2016, 5 (12), 1631-1643.
10. Zhang, J. M.; Zhu, X. L.; Xue, J.; Liu, X.; Long Zheng, X.; Chang, Y. J.; Liu, K. Y.; Huang, X. J.; Zhang, X. H., Integrated mRNA and miRNA profiling revealed deregulation of cellular stress response in bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with immune thrombocytopenia. *Funct Integr Genomics* 2018, 18 (3), 287-299.
11. Rossi, F.; Bernardo, M. E.; Bellini, G.; Luongo, L.; Conforti, A.; Manzo, I.; Guida, F.; Cristino, L.; Imperatore, R.; Petrosino, S.; Nobili, B.; Di Marzo, V.; Locatelli, F.; Maione, S., The cannabinoid receptor type 2 as mediator of mesenchymal stromal cell immunosuppressive properties. *PLoS One* 2013, 8 (11), e80022.
12. Rossi, F.; Mancusi, S.; Bellini, G.; Roberti, D.; Punzo, F.; Vetrella, S.; Matarese, S. M.; Nobili, B.; Maione, S.; Perrotta, S., CNR2 functional variant (Q63R) influences childhood immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2011, 96 (12), 1883-5.
13. Feng, Q.; Xu, M.; Yu, Y. Y.; Hou, Y.; Mi, X.; Sun, Y. X.; Ma, S.; Zuo, X. Y.; Shao, L. L.; Hou, M.; Zhang, X. H.; Peng, J., High-dose dexamethasone or all-trans-retinoic acid restores the balance of macrophages towards M2 in immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2017, 15 (9), 1845-1858.
14. Punzo, F.; Bellini, G.; Tortora, C.; Pinto, D. D.; Argenziano, M.; Pota, E.; Paola, A. D.; Martino, M. D.; Rossi, F., Mifamurtide and TAM-like macrophages: effect on proliferation, migration and differentiation of osteosarcoma cells. *Oncotarget* 2020, 11 (7), 687-698.
15. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S. A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J. T.; Sahebkar, A., Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018, 233 (9), 6425-6440.
16. Shao, X.; Wu, B.; Cheng, L.; Li, F.; Zhan, Y.; Liu, C.; Ji, L.; Min, Z.; Ke, Y.; Sun, L.; Chen, H.; Cheng, Y., Distinct alterations of CD68(+)CD163(+) M2-like macrophages and myeloid-derived suppressor cells in newly diagnosed primary immune thrombocytopenia with or without CR after high-dose dexamethasone treatment. *J Transl Med* 2018, 16 (1), 48.
17. Wynn, T. A.; Chawla, A.; Pollard, J. W., Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013, 496 (7446), 445-55.
18. Samson, M.; Fraser, W.; Lebowitz, D., Treatments for Primary Immune Thrombocytopenia: A Review. *Cureus* 2019, 11 (10), e5849.

19. Burness, C. B.; Keating, G. M.; Garnock-Jones, K. P., Eltrombopag: A Review in Paediatric Chronic Immune Thrombocytopenia. *Drugs* 2016, 76 (8), 869-78.
20. Fattizzo, B.; Levati, G.; Cassin, R.; Barcellini, W., Eltrombopag in Immune Thrombocytopenia, Aplastic Anemia, and Myelodysplastic Syndrome: From Megakaryopoiesis to Immunomodulation. *Drugs* 2019, 79 (12), 1305-1319.
21. Kim, T. O.; Despotovic, J.; Lambert, M. P., Eltrombopag for use in children with immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 2018, 2 (4), 454-461.
22. Bao, W.; Bussel, J. B.; Heck, S.; He, W.; Karpoff, M.; Boulad, N.; Yazdanbakhsh, K., Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood* 2010, 116 (22), 4639-45.
23. Li, X.; Zhong, H.; Bao, W.; Boulad, N.; Evangelista, J.; Haider, M. A.; Bussel, J.; Yazdanbakhsh, K., Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 2012, 120 (16), 3318-25.
24. Liu, X. G.; Liu, S.; Feng, Q.; Liu, X. N.; Li, G. S.; Sheng, Z.; Chen, P.; Liu, Y.; Wei, Y.; Dong, X. Y.; Qin, P.; Gao, C.; Ma, C.; Zhang, L.; Hou, M.; Peng, J., Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fcγ receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP. *Blood* 2016, 128 (6), 852-61.
25. Punzo, F.; Tortora, C.; Argenziano, M.; Casale, M.; Perrotta, S.; Rossi, F., Iron chelating properties of Eltrombopag: Investigating its role in thalassemia-induced osteoporosis. *PLoS One* 2018, 13 (12), e0208102.
26. Vlachodimitropoulou, E.; Chen, Y. L.; Garbowski, M.; Koonyosying, P.; Psaila, B.; Sola-Visner, M.; Cooper, N.; Hider, R.; Porter, J., Eltrombopag: a powerful chelator of cellular or extracellular iron(III) alone or combined with a second chelator. *Blood* 2017, 130 (17), 1923-1933.
27. Zhu, L.; Zhao, Q.; Yang, T.; Ding, W.; Zhao, Y., Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol* 2015, 34 (1), 82-100.
28. Rossi, F.; Tortora, C.; Palumbo, G.; Punzo, F.; Argenziano, M.; Casale, M.; Di Paola, A.; Locatelli, F.; Perrotta, S., CB2 Receptor Stimulation and Dexamethasone Restore the Anti-Inflammatory and Immune-Regulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells of Children with Immune Thrombocytopenia. *Int J Mol Sci* 2019, 20 (5), 1049.
29. Di Paola, A.; Palumbo, G.; Merli, P.; Argenziano, M.; Tortora, C.; Strocchio, L.; Roberti, D.; Santoro, C.; Perrotta, S.; Rossi, F., Effects of Eltrombopag on In Vitro Macrophage Polarization in Pediatric Immune Thrombocytopenia. *Int J Mol Sci* 2020, 22 (1), 97.
30. Andrews, NC.; Schmidt PJ., Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol* 2007, 69, 69–85.

31. Camaschella, C.; Nai, A.; Silvestri, L., Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica* 2020, 105 (2), 260–272.
32. Chifman, J.; Laubenbacher, R.; Torti, SV., A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2014, 844, 201–225.
33. Di Paola, A.; Palumbo, G.; Tortora, C.; Argenziano, M.; Catanoso, M.; Di Leva, C.; Ceglie, G.; Perrotta, S.; Locatelli, F.; Rossi, F., Eltrombopag in paediatric immune thrombocytopenia: Iron metabolism modulation in mesenchymal stromal cells. *Br J Haematol* 2022, 197 (1), 110-119.