

BIOLOGIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Il sistema immunitario è costituito da una rete di componenti cellulari e solubili interagenti tra loro. La sua funzione è quella di distinguere le entità presenti all'interno dell'organismo come "self" o come "non-self" e di eliminare quelle che appartengono al non-self. Le principali entità non-self sono i microrganismi, ma sono importanti anche le neoplasie, i trapianti e alcune sostanze estranee (es., alcune tossine). Per svolgere i suoi compiti, il sistema immunitario ha evoluto due meccanismi: le difese naturali aspecifiche e l'immunità vera e propria, le quali sono legate una all'altra e si influenzano reciprocamente.

Difese naturali aspecifiche (innate)

Questa tipologia di difese è filogeneticamente più antica, è presente fin dalla nascita, non necessita di un precedente contatto con la sostanza lesiva e non dà luogo a memoria immunitaria. Le difese naturali comprendono le barriere meccaniche, come la cute, e le barriere chimiche, come il succo acido gastrico. Esistono due **componenti cellulari**: (1) il sistema fagocitario, la cui funzione è quella di ingerire e digerire i microrganismi invasori e (2) le cellule natural killer (NK), la cui funzione è quella di eliminare alcuni tipi di tumori, di microrganismi e di cellule infettate da virus. Le **componenti solubili** sono costituite dalle proteine del complemento, dai reattanti di fase acuta e dalle citochine.

I fagociti includono i neutrofilo e i monociti (nel sangue) e i macrofagi (nei tessuti). Ampiamente distribuiti, i macrofagi sono localizzati in maniera strategica nei punti in cui i tessuti sono a contatto con il sangue o con gli spazi cavitari; ne sono esempi i macrofagi alveolari (nei polmoni), le cellule di Kupffer (nei sinusoidi epatici), le cellule sinoviali (nelle cavità articolari), le cellule microgliali perivascolari (a protezione del SNC), i fagociti mesangiali (nei reni).

Le citochine sono polipeptidi non immunoglobulinici secreti dai monociti e dai linfociti in risposta alla loro interazione con un antigene (Ag) specifico, con un Ag aspecifico, oppure in risposta a uno stimolo aspecifico solubile (es. endotossine, altre citochine). Le citochine modulano l'ampiezza delle risposte infiammatorie o immunitarie. Sebbene la loro secrezione possa essere indotta dall'interazione di un linfocita con il suo Ag specifico, le citochine non sono Ag-specifiche; pertanto esse costituiscono un tramite tra l'immunità innata e quella adattativa.

Immunità specifica (adattativa)

Le caratteristiche distintive dell'immunità adattativa sono la capacità di apprendimento, l'adattabilità e la memoria. La sua componente cellulare è costituita dai linfociti, mentre le immunoglobuline (Ig) ne rappresentano la componente solubile.

I linfociti sono divisi in due sottopopolazioni: quelli derivati dal timo (cellule T) e quelli derivati dal midollo osseo (cellule B). I linfociti sono ripartiti in cloni e ogni clone si specializza nel riconoscimento di un Ag specifico per mezzo del suo recettore per l'Ag. Poiché il numero degli Ag è potenzialmente illimitato, questa specializzazione sembrerebbe gravare il sistema immunitario di un carico eccessivo, ma il complesso problema di dover provvedere a un numero infinito di cloni altamente specifici viene risolto grazie alla capacità dei geni per il recettore antigenico dei linfociti di riarrangiarsi in una serie di combinazioni pressoché illimitate.

La funzione di recettore per l'Ag sulla membrana delle cellule B è svolta dalle **immunoglobuline di superficie (sIg)**. Dopo che le cellule B hanno legato un Ag solubile per mezzo delle loro sIg, una serie di eventi cellulari (es. proliferazione, differenziazione) porta alla secrezione di una Ig che

costituisce l'anticorpo (Ac) specifico per quell'Ag. L'opinione attuale è che il corredo anticorpale che un organismo possiede prima di venire in contatto con gli Ag sia costituito da Ac prodotti durante la maturazione delle cellule B attraverso riarrangiamenti dei geni per le Ig. Per capire la natura dell'organizzazione dei geni per le Ig è necessario comprendere la struttura delle Ig.

Le Ig sono composte di due catene pesanti e due catene leggere, ognuna con regioni costanti (C) e regioni variabili (V). L'Ag viene legato in corrispondenza della regione variabile. A livello genico, la regione C viene codificata dai geni per la regione C e la regione V viene codificata dai geni per le regioni V e J (per le catene leggere) e dai geni per le regioni V, D e J (per le catene pesanti). Questi segmenti genici non sono disposti in modo continuo sul cromosoma, ma hanno piuttosto una disposizione discontinua e devono essere giustapposti durante la maturazione delle cellule B. Così, per sintetizzare una catena pesante, uno dei diversi segmenti D (ne sono stati identificati almeno 12) si congiunge con uno dei 6 segmenti J. Questo cluster genico si congiunge poi con uno delle diverse centinaia (probabilmente migliaia) di segmenti genici per la regione V, per dare luogo a un'unità trascrizionale completa per una catena immunoglobulinica pesante.

A seconda di quale particolare segmento di ciascuna regione genica viene utilizzato, è possibile ottenere un ampissimo numero di molecole Ig con differenti specificità. Le potenzialità della diversità anticorpale vengono ulteriormente incrementate dall'aggiunta di nucleotidi in sequenza casuale in corrispondenza dei siti di giunzione (tra le regioni V, D e J), dovuta a mutazioni puntiformi somatiche e a imprecisioni nell'assemblaggio dei diversi segmenti. Il corredo anticorpale di un organismo prima dell'esposizione agli Ag si ritiene sia costituito da Ac prodotti durante la maturazione delle cellule B attraverso riarrangiamenti dei geni per le Ig.

Le cellule T non possiedono sIg, ma riconoscono gli Ag attraverso il loro strumento di riconoscimento principale, il **recettore delle cellule T (T-Cell Receptor, TCR)** e altre molecole di adesione accessorie. I geni che codificano per il TCR appartengono alla superfamiglia dei geni delle Ig; analogamente ai geni per le Ig, essi vanno incontro a ricombinazione, dando luogo così a un gran numero di cloni di cellule T, ciascuno dotato di una responsività antigenica specifica.

La porzione del TCR che lega l'Ag è formata da due catene (ab o gd), ciascuna delle quali possiede una regione costante e una regione variabile. Diversamente dalla molecola Ig, che si trova isolata sulla superficie della cellula B, il TCR è associato con la molecola del CD3; l'intera unità è chiamata **complesso TCR/CD3**. Sebbene le catene del TCR siano soggette al riarrangiamento genico e possiedano una loro variabilità, le catene del CD3 (formato da almeno cinque subunità) sono invariabili e non sono Ag-specifiche. Alcuni Ac anti-CD3 attivano le cellule T in maniera diretta, senza la necessità della presenza dell'Ag. Il CD3 svolge quindi un ruolo importante nella trasduzione del segnale di attivazione attraverso la membrana linfocitaria.

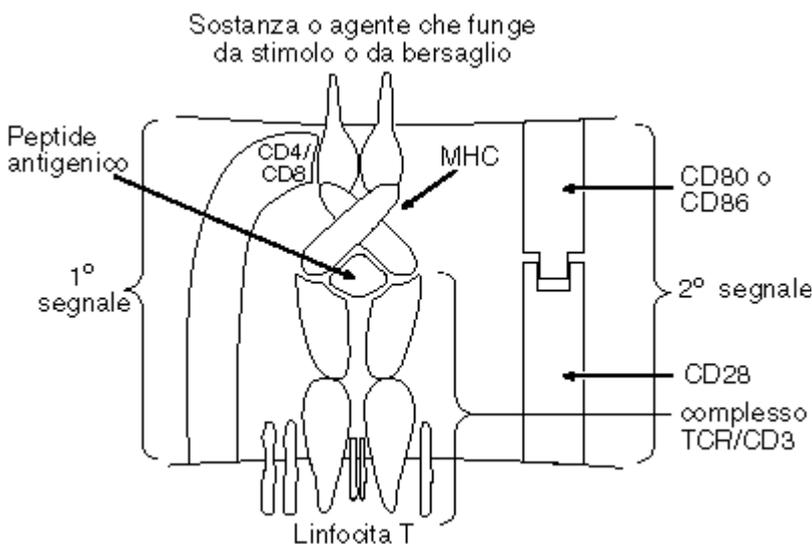
I linfociti possono essere ulteriormente suddivisi in sottopopolazioni a seconda della funzione che svolgono o dei loro marker di superficie. Le sottopopolazioni linfocitarie sono state identificate grazie alle diverse combinazioni di determinate molecole presenti sulla loro membrana: questi marker di superficie sono stati denominati **cluster di differenziazione (CD)**. Fino a oggi, sono stati identificati 166 CD.

Complesso maggiore di istocompatibilità

La capacità del sistema immunitario di differenziare il self dal non-self è in larga parte determinata dai prodotti del complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC), i cui geni si trovano sul cromosoma 6, appartengono alla superfamiglia dei geni delle Ig e sono soggetti a ricombinazione genica. I prodotti del MHC di **classe I** sono costituiti dagli HLA-A,

-B e-C; essi sono ampiamente distribuiti nell'organismo e sono presenti sulla superficie di tutte le cellule nucleate e sulle piastrine. I prodotti del MHC di **Classe II** sono costituiti dagli HLA-D, -DR, -DP e-DQ; essi hanno una distribuzione più limitata sulle cellule B, sui macrofagi, sulle cellule dendritiche, sulle cellule di Langerhans e sulle cellule T attivate (ma non su quelle quiescenti).

Le cellule B sono in grado di rispondere agli Ag solubili, ma le cellule T lo fanno raramente e riconoscono l'Ag solamente quando è associato al MHC; esse riconoscono quindi il complesso MHC/Ag. Il meccanismo attraverso il quale l'Ag viene processato e associato al MHC prima di essere presentato alle cellule T viene realizzato dalle **cellule di presentazione dell'antigene (Antigen-Presenting Cells, APC)**, es. le cellule di Langerhans, i monociti, i macrofagi, le cellule dendritiche follicolari e le cellule B. Sebbene i particolari non siano pienamente compresi, sembra che per essere processato l'Ag debba essere esposto, degradato e frammentato. Nel caso della presentazione esogena, l'Ag viene sottoposto a endocitosi e degradazione all'interno dei lisosomi, viene associato ai prodotti del MHC di classe II e viene trasportato fino alla superficie cellulare. Nel caso della presentazione endogena, l'Ag viene prodotto intracellularmente (es. da un'infezione virale) e viene sottoposto a degradazione al di fuori dei lisosomi, all'interno di organuli chiamati proteosomi. I peptidi che ne risultano vengono trasferiti al reticolo endoplasmatico rugoso (RER) per mezzo di proteine di trasporto. Una volta all'interno del RER, questi peptidi vengono associati con i prodotti del MHC di classe I per poi essere trasportati fino alla superficie cellulare. È importante sapere se l'Ag viene associato con il MHC di classe I o di classe II, perché le molecole CD4 e CD8 agiscono come molecole di adesione accessorie legandosi rispettivamente agli Ag di classe II o di classe I. L'interazione del TCR con il complesso MHC/Ag può non essere sufficiente per indurre l'attivazione delle cellule T. È necessaria la presenza di un segnale di coattivazione; questo secondo segnale è mediato dall'interazione del CD28 presente sulla superficie delle cellule T con il CD80 o il CD86 presente sulle APC. L'assenza dell'interazione CD28/CD80-CD86 può rendere la cellula T anergica o tollerante.



Modello dei due segnali per l'attivazione delle cellule T. La perdita del 2° segnale ha come risultato l'anergia o la tolleranza. MHC = complesso maggiore di istocompatibilità; TCR = recettore della cellula T.

Citochine

Sebbene sia necessario un intimo contatto cellulare perché le risposte T-cellulari siano ottimali, le cellule T e i monociti secernono citochine, le quali sono in grado di influenzare eventi biologici che

avvengono localmente o a distanza. Esse interagiscono con specifici recettori della superficie cellulare e possono agire in maniera autocrina o paracrina.

Le citochine possono essere divise in diversi gruppi, i quali comprendono gli interferoni (IFN-a, b e g), il tumor necrosis factor (TNF-a e b), le interleuchine (dall'IL-1 all'IL-18), i transforming growth factor e i colony stimulating factor (CSF) emopoietici. Per le principali citochine, le loro origini cellulari e i loro effetti fondamentali.

Anche se le diverse citochine e i loro effetti vengono di solito elencati separatamente, è importante ricordare che in una determinata risposta immunitaria le citochine agiscono di concerto, in coppia, oppure in conflitto tra loro. Per esempio l'IL-1 induce la secrezione di IL-2; l'IL-2, l'IL-4 e l'IL-6 possono agire sinergicamente nella generazione dei linfociti T citotossici; l'IL-4 e l'IFN-g possono neutralizzare l'uno gli effetti dell'altro nell'induzione dell'espressione degli Ag di classe II sulle cellule B e nell'induzione della secrezione di IgE.

L'orchestrazione contemporanea di diverse risposte e la ridondanza del sistema immunitario sono forse illustrate al meglio dalla struttura di alcuni dei recettori per le interleuchine. Il recettore per l'IL-2 è costituito da tre catene: a, b e g. L'espressione di tutte e tre le catene dà luogo al recettore per l'IL-2 ad alta affinità; l'espressione delle catene b e g dà luogo solo a un recettore per l'IL-2 ad affinità intermedia, mentre la catena a rappresenta soltanto un recettore a bassa affinità. È stato dimostrato recentemente che mutazioni o una delezione a carico della catena g del recettore per l'IL-2 costituiscono le basi molecolari dell'immunodeficienza combinata grave (Severe Combined ImmunoDeficiency, SCID) legata al cromosoma X. È interessante notare che mutazioni a carico delle catene a o b del recettore per l'IL-2 non provocano SCID (almeno nei modelli animali). Questa apparente discrepanza si verifica perché la catena g del recettore per l'IL-2 entra anche nella costituzione del complesso recettoriale per l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 e l'IL-15; questa catena viene adesso denominata catena g comune (gc). Il recettore per l'IL-15 condivide le catene b e gc con il recettore per l'IL-2. La catena a del recettore per l'IL-13 è identica alla catena a del recettore per l'IL-4. I recettori per l'IL-3, l'IL-5 e il GM-LCR possiedono tutti una catena b identica.

Una nuova famiglia di citochine è quella che è stata appropriatamente denominata delle **chemiochine**; esse inducono la chemiotassi e la migrazione delle sottopopolazioni dei leucociti. Esistono quattro sottotipi di chemiochine, i quali sono definiti in base al numero di aminoacidi interposti tra i primi due residui di cisteina della molecola. Alcuni dei recettori per le chemiochine potrebbero servire come corecettori per l'ingresso del HIV all'interno dei monociti/macrofagi.

PRINCIPALI CITOCHINE

Citochine	Massa molecolare	Produzione	Effetti principali
Interleuchine (IL)			
IL-1 α , IL-1 β	15-17	Monociti, macrofagi	Febbre (pirogeno endogeno), sonno, anoressia, infiammazione, espressione del CD4 e rilascio di fattore tissutale da parte delle cellule endoteliali, attivazione dei linfociti, produzione di IL-6 e CSF
IL-2	14-15	cellule T	Induzione della crescita delle cellule T, costimolazione della crescita e della differenziazione delle cellule B, aumento delle

			NK e delle LAK
IL-3	14-28	cellule T, mast-cellule	Induzione della crescita delle mast-cellule, crescita delle cellule emopoietiche pluripotenti
IL-4	20	cellule T, mast-cellule	Induzione della crescita delle cellule T e della generazione dei CTL, costimolazione della crescita delle cellule B, sinergismo con l'IL-3 nella crescita delle mast-cellule, della produzione di IgE e IgG4, induzione dell'espressione e del rilascio del CD23, del MHC di classe II sulle cellule B, switch da T _H a T _{H2}
IL-5	45	cellule T, mast-cellule	Induzione della differenziazione degli eosinofili, della produzione di IgA, costimolazione della crescita delle cellule B nei topi
IL-6	23-30	Monociti, fibroblasti, cellule T (topo)	Pirogeno, induzione della crescita dei plasmocitomi e degli ibridomi, amplificazione della produzione di Ig, del MHC di classe I sui fibroblasti, sinergismo con l'IL-2 nella produzione delle proteine di fase acuta da parte degli epatociti, sinergismo con l'IL-3 nella crescita delle cellule emopoietiche, induzione della differenziazione dei CTL
IL-7	25	Cellule stromali del midollo osseo e del timo	Induzione della proliferazione delle cellule pro-B e pre-B e dei timociti immaturi
IL-8 (chemiocina)	6,5	Monociti, cellule endoteliali, macrofagi alveolari, fibroblasti	Induzione della chemiotassi e dell'attivazione dei neutrofili e delle cellule T
IL-9	30-40	cellule T	Induzione della proliferazione di alcune cellule T, potenziamento della crescita delle mast-cellule indotta dall'IL-3
IL-10	17-21	cellule T, cellule B attivate, monociti	↓ del MHC di classe II, inibizione dell'attivazione del MAC, ↓ della presentazione dell'antigene, stimolazione della proliferazione delle cellule B e della produzione di Ac, stimolazione delle mast-cellule, switch da T _H a T _{H2}
IL-11	24	Cellule del microambiente emopoietico	Stimolazione della produzione di Ac, sinergismo con l'IL-3 nella proliferazione dei megacariociti, stimolazione dei precursori dei macrofagi
IL-12	75	Monociti, macrofagi, alcune cellule B, alcune mast-cellule	Attivazione della secrezione di IFN-g da parte delle NK, switch da T _H a T _{H1} , inibizione della

			secrezione di IgE indotta dall'IL-4
IL-13	10	cellule B, macrofagi	Induzione della secrezione di IgE
IL-14	?	cellule T	Induzione del fattore di crescita delle cellule B
IL-15	14-15	Cellule non linfoidi, muscolo	Induzione della crescita e della citotossicità delle cellule NK, differenziazione delle cellule NK
IL-16	56	cellule T (preformata nei CD8)	Chemiotassi dei CD4, induzione del CD25, del MHC di classe II, repressione della trascrizione dell'HIV
IL-17	20-30	Cellule CD4 di memoria	Costimolazione della proliferazione delle cellule T, induzione della secrezione di IL-6, IL-8 e G-CSF da parte delle cellule epiteliali, endoteliali e fibroblastiche
IL-18 (nome non ufficiale)	?	?	Induzione del fattore inducente l'IFN- γ , simile all'IL-1
Interferoni (IFN)			
IFN- α	18-20	Leucociti	Inibizione della replicazione virale e della crescita tumorale, dell'espressione del MHC di classe I e di classe II, dell'attività NK, modulazione della risposta Ac
IFN- β	20	Fibroblasti	Stesse attività dell'IFN- α
IFN- γ	20-25	cellule T, NK	del MHC di classe I e di classe II, attivazione dei macrofagi, dell'attività NK, \downarrow della secrezione di CD23 e di IgE indotta dall'IL-4, costimolazione della crescita e della differenziazione delle cellule B
Tumor necrosis factor (TNF)			
TNF- α (cachessina)	17	Monociti, macrofagi	Induzione dell'IL-1, delle molecole di adesione e del MHC di classe I sulle cellule endoteliali, pirogeno, induzione del GM-CSF, effetto citotossico/citostatico, induzione della secrezione di IFN- γ
TNF- β	25	cellule T	Fattore citotossico
Colony-stimulating factor (CSF)			
GM-CSF	14-35	cellule T, macrofagi, monociti, cellule endoteliali	Induzione della crescita dei precursori dei granulociti e dei monociti, attivazione dei macrofagi, della produzione di leucotrieni da parte degli eosinofili, dell'attività tumoricida

			dei monociti
G-CSF	18-22	Monociti, fibroblasti, cellule endoteliali	Induzione della crescita dei granulociti
M-CSF	70-90	Monociti, fibroblasti, cellule endoteliali	Induzione della crescita dei monociti
Transforming growth factor (TGF)			
TGF- α	5-20	Tumori solidi (carcinomi >sarcomi), monociti	Induzione dell'angiogenesi, proliferazione dei cheratinociti, riassorbimento osseo, crescita tumorale
TGF- β	25	Piastrine, placenta, rene, osso, cellule T e B	Induzione della proliferazione dei fibroblasti; sintesi del collagene e della fibronectina; inibizione dei CTL, delle NK e delle LAK; inibizione della proliferazione delle cellule T e B; potenziamento della guarigione delle ferite e dell'angiogenesi
Chemiochine			
C (mancante del primo e del terzo residuo di cisteina conservato) . Esempio: linfotassina (LPTN)	15	CD8 attivati, NK, mast-cellule?	Induzione della chemiotassi delle cellule T e delle cellule NK
C-C Diversi esempi: MIP-1 α , RAN-TES, MIP-1 β , eotassine, MCP-1, MCP-3	Variabile	Variabile	Induzione della chemiotassi delle cellule T, delle cellule NK, dei basofili e degli eosinofili
C-X-C Diversi esempi: IL-8, IP-10, SDF-1	Variabile	Variabile	Induzione della chemiotassi delle cellule T, delle mast-cellule, dei monociti e degli eosinofili
C-X ₃ -C Frattalchine descritte di recente	Variabile	Variabile	Ancora non ben caratterizzati
<p>=aumento; ↓=diminuzione; Ac=anticorpi; CSF=colony-stimulating factor; CTL=linfociti T citotossici; G=granulociti; GM=granulociti/macrofagi; LAK=cellule killer attivate dalle linfocine; MAC=complesso di attacco alla membrana; MHC=complesso maggiore di istocompatibilità; NK=cellule natural killer; T_H=T helper.</p>			

CELLULE B E IMMUNITA' UMORALE

Le cellule B costituiscono dal 5 al 15% dei linfociti del sangue e sono morfologicamente indistinguibili dalle cellule T. Tuttavia, esse possono essere riconosciute fenotipicamente per la presenza di sIg (sIgM sulle cellule B immature; sIgM e sIgD sulle cellule B mature antigenicamente vergini; sIgG, sIgA o sIgE sulle cellule B che hanno subito lo switch isotipico) e per la presenza del CD19, CD20, CD21 (CR2), CD49c, CD72 e CD80. Inoltre le cellule B possono esprimere il MHC di classe II e una varietà di altri CD che non sono loro specifici. All'interno dei linfonodi, le cellule B si trovano nella zona corticale sottocapsulare esterna nel contesto dei follicoli primari e secondari e nei cordoni midollari; nella milza, esse sono contenute nella zona marginale e nei follicoli.

Le cellule B sembrano svilupparsi secondo una serie di fasi programmate. Queste tappe hanno inizio nel midollo osseo con la cellula staminale orientata, proseguono attraverso gli stadi di cellula pro-B precoce e tardiva (con riarrangiamento dei geni D-J per le catene pesanti) e lo stadio di cellula pre-B (con riarrangiamento definitivo dei geni V-DJ per le catene pesanti e comparsa di catene m nel citoplasma e sulla superficie cellulare), e si concludono con la cellula B immatura (con riarrangiamento V-J per le catene leggere e comparsa di IgM di membrana). Non sembra che l'Ag abbia un ruolo nell'indirizzare questa sequenza, ma l'interazione delle cellule B immature con l'Ag può condurre all'inattivazione clonale o alla tolleranza. Le cellule B immature che non vengono inattivate possono continuare a svilupparsi fino a diventare cellule B mature antigenicamente vergini e lasciare il midollo per colonizzare gli organi linfoidei periferici. In essi, l'interazione tra sIgG e antigeni estranei le trasforma in linfoblasti. Giunte al termine della loro differenziazione, queste cellule B diventano plasmacellule, le quali secernono Ig di una sola classe.

Le cellule B presenti nei tessuti periferici sono preorientate a rispondere a un limitato numero di Ag. La prima interazione tra la cellula B e l'Ag è conosciuta come risposta immunitaria primaria e le cellule B orientate a rispondere a questo Ag vanno incontro a differenziazione e proliferazione clonale. Alcune divengono cellule di memoria; altre si differenziano in plasmacellule mature sintetizzanti Ac. Le caratteristiche principali della risposta immunitaria primaria sono la presenza di un periodo di latenza prima della comparsa degli Ac, la produzione soltanto di una piccola quantità di Ac, inizialmente IgM e successivamente uno switch dell'isotipo delle Ig (con la collaborazione delle cellule T) verso le IgG, le IgA o le IgE. Ciò porta alla generazione di un gran numero di cellule di memoria in grado di rispondere in futuro al medesimo Ag.

La risposta immunitaria secondaria (anamnestica o amplificata) ha luogo in occasione dei successivi contatti con lo stesso Ag. Le sue caratteristiche principali sono la rapida proliferazione delle cellule B, la rapida differenziazione in plasmacellule mature e la sollecita produzione di grandi quantità di Ac, soprattutto IgG, che vengono liberati nel sangue e in altri tessuti dell'organismo dove possono venire a contatto con l'Ag in condizioni ottimali e reagire efficacemente con esso.

In risposta al medesimo Ag possono essere prodotte IgM, IgG e IgA. Così le cellule B derivate da una singola cellula B matura antigenicamente vergine possono differenziarsi in una famiglia di cellule B geneticamente programmate per sintetizzare Ac aventi una singola specificità antigenica, con cloni rappresentativi orientati alla produzione di ciascuna delle classi delle Ig (p. es. IgM, IgG, IgA).

Le cellule B possono rispondere all'Ag in maniera T-dipendente oppure T-indipendente. Gli Ag T-indipendenti (p. es. i polisaccaridi dello pneumococco, i lipopolisaccaridi dell'*Escherichia coli* e le polivinilpirrolidone) sono sostanze ad alto peso molecolare con determinanti antigenici ripetitivi

disposti in sequenza lineare e sono molto resistenti alla degradazione da parte degli enzimi dell'organismo. Essi evocano essenzialmente una risposta di tipo IgM.

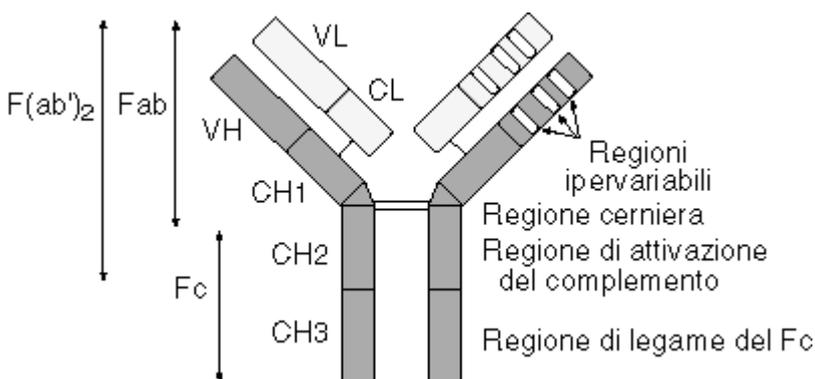
La maggior parte degli Ag naturali è T-dipendente e necessita della processazione da parte delle cellule presentanti l'Ag (APC). Queste APC presentano l'Ag sia alle cellule T sia a quelle B. Le cellule T liberano citochine che inducono le cellule B a rispondere all'Ag producendo Ac. Durante la stimolazione antigenica delle cellule B, si verifica uno switch dalla produzione di IgM a quella di IgG. Questo switch isotipico è dipendente dalle cellule T helper (T_H) e può richiedere l'intervento di differenti sottopopolazioni di cellule T_H e di citochine specifiche. Per esempio, l'IL-4 o l'IL-13 sono necessarie per lo switch isotipico da IgM a IgE.

Antigeni e anticorpi

Struttura degli antigeni e antigenicità: un Ag è una sostanza in grado di evocare risposte immunitarie specifiche. Una volta prodotti, gli Ac sono quindi in grado di combinarsi con Ag specifici, più o meno come i pezzi di un puzzle. Gli Ac riconoscono i siti di combinazione degli Ag, i quali consistono in configurazioni steriche specifiche (epitopi o determinanti antigenici) sulle superfici di grandi molecole ad alto peso molecolare (p. es. proteine, polisaccaridi e acidi nucleici). La presenza di un epitopo di questo genere rende una molecola un Ag. I siti di combinazione dell'Ac e dell'Ag si incastrano saldamente tra loro con una potente forza attrattiva, perché le aree di appaiamento sulla superficie di ciascuna molecola sono relativamente ampie. La stessa molecola anticorpale può inoltre reagire in maniera crociata con Ag tra loro correlati, se i determinanti sulla loro superficie sono sufficientemente simili a quelli presenti sull'Ag originale.

Le sostanze sono immunogene (antigeniche) se il sistema immunitario è in grado di riconoscerne i determinanti antigenici come estranei (non-self) e se il peso molecolare della sostanza è sufficientemente elevato. Un aptene è una sostanza con peso molecolare inferiore a quello di un Ag, la quale è capace di reagire in maniera specifica con un Ac, ma che non è in grado di indurre la formazione di Ac a meno che non sia legata a un'altra molecola, solitamente una proteina (la proteina carrier); p. es. la penicillina è un aptene che può legarsi all'albumina.

Struttura degli anticorpi: le molecole anticorpali sono Ig che possiedono sequenza aminoacidica e una struttura terziaria particolari, che conferiscono loro la capacità di legarsi a una struttura complementare situata sull'Ag. Nonostante tutte le Ig siano probabilmente Ac, non è sempre possibile conoscere l'Ag contro il quale ciascuna Ig è diretta. La reazione Ag-Ac può svolgere un ruolo specifico nella protezione dell'ospite contro virus, batteri e altri patogeni. Le Ig sono responsabili della maggior parte della frazione g-globulinica delle proteine plasmatiche.



Schema della molecola immunoglobulinica che mostra le catene pesanti e le catene leggere. CH = regione costante della catena pesante; CL = regione costante della catena leggera; Fab = frammento legante l'antigene; Fc = frammento cristallizzabile; VH = regione variabile della catena pesante; VL = regione variabile della catena leggera.

Le molecole anticorpali sono estremamente eterogenee e nel loro complesso sono in grado di combinarsi con un numero di Ag praticamente illimitato, tuttavia condividono alcune caratteristiche comuni. Nell'ambito di ciascuna classe, le Ig monomeriche possiedono una struttura analoga. Ciascuna molecola è composta da quattro catene polipeptidiche, due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche. Le catene pesanti hanno ciascuna un peso molecolare variabile da 50000 a 70000 dalton e ogni catena leggera ha un peso molecolare di circa 23000 dalton. Ponti disolfuro uniscono le catene tra loro e conferiscono alla molecola la configurazione a Y comunemente conosciuta.

La molecola Ig a forma di Y si compone di una regione variabile (V) e di una regione costante (C). La regione V è situata alle estremità distali delle braccia della Y ed è chiamata così a causa dell'alta variabilità degli aminoacidi che vi si trovano, i quali determinano di volta in volta la capacità dell'Ig di combinarsi con l'Ag. La regione C, prossimale al sito di combinazione con l'Ag, contiene una sequenza aminoacidica relativamente costante la quale è caratteristica di ciascuna classe di Ig .

Le regioni ipervariabili situate all'interno delle regioni V contengono i determinanti idiotipici, ai quali possono legarsi gli Ac naturali (chiamati Ac anti-idiotipo). Il legame dell'Ac anti-idiotipo con il suo determinante idiotipico è importante per la regolazione delle risposte B-cellulari. Al contrario, i determinanti allotipici presenti nella regione C danno origine ad Ac anti-allotipo, i quali possiedono specificità di classe. Quindi, ciascun clone di cellule B produce la sua Ig specifica, avente una specifica sequenza aminoacidica, la quale si combina con una particolare configurazione antigenica. Ciò nonostante, i membri di ogni clone possono modificare la classe della molecola Ig che producono, mantenendo tuttavia invariate le catene leggere e le regioni V.

Per studiare la relazione esistente fra struttura e funzione, le molecole degli Ac sono state frammentate con l'impiego di enzimi proteolitici. La papaina scinde le Ig in due frammenti monovalenti, i Fab (che contengono il sito di legame per l'Ag) e un frammento singolo, l'Fc (cristallizzabile). Il frammento Fab è formato da una catena leggera e da una parte di una catena pesante e contiene le regioni V della molecola Ig (i siti di combinazione). Il frammento Fc contiene la maggior parte della regione C; questo frammento è responsabile dell'attivazione del complemento e si lega ai recettori per l'Fc presenti sui fagociti. La pepsina produce un frammento chiamato $F(ab')_2$, il quale è formato dai due Fab e da una porzione delle catene pesanti che contiene i ponti disolfuro.

Nell'uomo, ogni classe principale di Ig possiede una catena pesante corrispondente; le catene pesanti m, g, a, e e d si trovano rispettivamente nelle IgM, nelle IgG, nelle IgA, nelle IgE e nelle IgD. Nelle cinque classi di Ig dell'uomo esistono solo due tipi di catene leggere, l e k. In questo modo, esistono 10 tipi differenti di molecole Ig (p. es. IgG-l, IgG-k). Tre classi (le IgG, le IgD e le IgE) esistono solo in forma monomerica. Le IgM circolano nel sangue in forma pentamerica o monomerica. Come pentamero, le IgM contengono cinque molecole a forma di Y (10 catene pesanti e 10 catene leggere). Le IgA esistono come monomeri, dimeri e trimeri. Le IgG possiedono quattro sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4); le IgA possiedono due sottoclassi (IgA1 e IgA2). Si comincia oggi ad associare specifiche funzioni biologiche alle varie sottoclassi (p. es. le IgG4 non fissano il

complemento né si legano ai monociti e le IgG3 hanno un'emivita significativamente più breve rispetto alle altre tre sottoclassi di IgG).

Sono state identificate anche strutture addizionali. Le catene di giunzione (Joining, J) tengono unite le cinque subunità delle IgM, come anche le subunità delle IgA. Le IgA secretorie possiedono una catena polipeptidica aggiuntiva, la componente secretoria (Secretory Component, SeC), prodotta dalle cellule epiteliali e aggiunta alla molecola IgA dopo la sua sintesi.

Per contrassegnare ciascuna classe di Ig sono stati tradizionalmente impiegati i coefficienti di sedimentazione, determinati con la tecnica dell'ultracentrifugazione. Le IgM hanno il più alto coefficiente di sedimentazione a 19S e le IgG hanno un coefficiente di circa 7S.

Proprietà biologiche degli anticorpi: la struttura aminoacidica della regione C della catena pesante determina l'isotipo della classe di Ig cui appartiene. Ogni classe svolge funzioni differenti.

Le IgM, i primi Ac che vengono sintetizzati in seguito a immunizzazione primaria (esposizione a un nuovo Ag), proteggono dalle aggressioni il compartimento intravascolare. Le molecole pentameriche delle IgM attivano prontamente il complemento e svolgono funzioni di opsonizzazione e di agglutinazione per collaborare con il sistema fagocitario nell'eliminazione di molti tipi di microrganismi. Le isoemoagglutinine e molti Ac diretti contro i microrganismi Gram - sono IgM. Le IgM monomeriche svolgono la funzione di recettori per l'Ag sulla membrana delle cellule B.

Le IgG, la classe di Ac sierici di gran lunga predominante, si possono trovare anche nei compartimenti extravascolari; vengono prodotte quando il titolo delle IgM comincia a decrescere dopo l'immunizzazione primaria. Le IgG sono le principali Ig prodotte in seguito a reimmunizzazione (risposta immunitaria di memoria o secondaria). Esse proteggono i tessuti dai batteri, dai virus e dalle tossine. Le IgG sono le uniche Ig in grado di attraversare la barriera placentare. Sottoclassi differenti di IgG neutralizzano le tossine batteriche, attivano il complemento e potenziano la fagocitosi grazie all'opsonizzazione. Le gamma-globuline disponibili in commercio sono costituite quasi interamente da IgG, con piccole quote di altre Ig.

Le IgA si trovano nelle secrezioni mucose (saliva, lacrime, secrezioni respiratorie, gastro-intestinale GI e genito-urinarie GU, oltre al colostro), dove provvedono a una difesa antibatterica e antivirale di primo livello. Le IgA secretorie vengono sintetizzate nelle regioni subepiteliali dell'apparato GI e di quello respiratorio e sono combinate con una componente secretoria (SeC) prodotta localmente. Alcune cellule produttrici di IgA si trovano nei linfonodi e nella milza. Le IgA sieriche non possiedono la SeC; esse conferiscono protezione nei confronti di *Brucella*, della difterite e della poliomielite.

Le IgD sono presenti nel siero in concentrazioni estremamente basse, ma compaiono anche sulla superficie delle cellule B in via di maturazione e potrebbero svolgere un ruolo importante nella loro crescita e nel loro sviluppo.

Le IgE (Ac reaginici, sensibilizzanti cutanei o anafilattici), come le IgA, si trovano principalmente nelle secrezioni mucose respiratorie e GI. Nel siero, sono presenti in concentrazioni molto basse. Le IgE interagiscono con le mast-cellule; il legame simultaneo di due molecole di IgE da parte di un allergene può provocare la degranolazione delle cellule, con il rilascio di mediatori chimici che causano una risposta di tipo allergico. I livelli sierici delle IgE sono elevati nelle malattie atopiche (p. es. asma allergico o estrinseco, febbre da fieno e dermatite atopica), nelle malattie parassitarie,

nel morbo di Hodgkin in fase molto avanzata e nel mieloma monoclonale a IgE. Le IgE possono svolgere un ruolo positivo nella difesa contro i parassiti.

Metodi di dosaggio delle immunoglobuline

Le IgG, le IgM e le IgA sono presenti nel siero in concentrazioni sufficientemente elevate da poter essere misurate con diverse tecniche che rilevano la presenza di qualsiasi Ag. Una metodica ormai datata è quella dell'immunodiffusione radiale (tecnica di Mancini), nella quale il siero contenente l'Ag viene posto in un pozzetto ricavato in una piastra di agar contenente l'Ac; la dimensione degli anelli di precipitazione che si formano nell'agar è proporzionale alla concentrazione dell'Ag nel siero. Per determinare le concentrazioni specifiche di numerose proteine sieriche, comprese le Ig, molti laboratori impiegano adesso la nefelometria, una metodica rapida e altamente riproducibile basata sul principio della dispersione della luce da parte delle molecole. Anche l'immuno-elettroforesi viene utilizzata occasionalmente per identificare le Ig, particolarmente le Ig monoclonali. Le IgE sono presenti nel siero in quantità talmente piccole che devono essere misurate con metodi radioimmunologici o con il test di immunoassorbimento enzimatico (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA). Le IgE dirette contro Ag specifici vengono misurate utilizzando il test di radioallergoassorbimento (RadioAllergoSorbent Test, RAST). Le sottoclassi delle Ig possono essere misurate utilizzando metodi radioimmunologici o l'ELISA.

Anticorpi monoclonali

Gli Ac presenti in vivo sono quasi sempre policlonali (cioè prodotti da più di un clone), tranne nel caso di una gammopatia monoclonale. Analogamente, fino a non molto tempo fa erano policlonali anche gli Ac indotti negli animali per essere utilizzati nei test diagnostici. La tecnica dell'ibridoma consente la produzione di grandi quantità di Ac monoclonali negli animali. Per prima cosa, un topo viene immunizzato con l'Ag desiderato. Quando il topo ha cominciato a produrre Ac, la sua milza viene prelevata per preparare una sospensione di cellule, alcune delle quali producono l'Ac corrispondente. Successivamente, queste cellule produttrici di Ac vengono ibridate con una linea cellulare di mieloma che è stata mantenuta in coltura tissutale e che non produce Ac. Le singole cellule ibridate che producono l'Ac monoclonale desiderato vengono isolate, coltivate in colture tissutali per aumentarne il numero e reinoculate in peritoneo di topo. In questo modo si può facilmente produrre e raccogliere liquido ascitico contenente l'Ac monoclonale per ottenere alte concentrazioni dell'Ac stesso. I laboratori di fermentazione producono preparazioni commerciali di Ac monoclonali.

Attualmente, gli Ac monoclonali vengono diffusamente impiegati per (1) dosare proteine e farmaci nel siero; (2) tipizzare i tessuti e il sangue; (3) identificare agenti infettivi; (4) identificare cluster di differenziazione (CD) per la classificazione e il follow-up delle leucemie e dei linfomi; (5) identificare Ag tumorali; (6) identificare autoanticorpi in molte patologie diverse. L'uso degli Ac monoclonali ha favorito l'identificazione della miriade di cellule coinvolte nella risposta immunitaria.

CELLULE T E IMMUNITA' CELLULARE

Le cellule T maturano, acquistano capacità funzionali e apprendono il concetto di self all'interno del timo. Il timo svolge il duplice compito della **selezione positiva** (i cloni che riconoscono il complesso MHC/Ag vengono posti in condizione di proliferare, maturare e migrare in periferia) e della **selezione negativa** (i cloni che reagiscono al self, riconoscendolo come estraneo, vengono eliminati). Gli esatti meccanismi cellulari e molecolari di questa selezione non sono del tutto conosciuti.

Durante lo sviluppo fetale la cellula staminale T, derivata dal midollo osseo, si sposta nel timo, dove matura e apprende il concetto di self. Si svolge quindi il processo della selezione timica e ai linfociti maturi viene consentito di lasciare la ghiandola; essi si ritrovano nel sangue periferico e all'interno dei tessuti linfoidi. Tutte le cellule T mature esprimono il CD4 o il CD8 in maniera mutuamente esclusiva.

Cellule T helper

Le cellule T che esprimono il CD4 vengono genericamente denominate linfociti T helper (T_H). Queste cellule possono essere suddivise in due categorie principali, a seconda della loro funzione, della risposta a diverse citochine e della capacità di secernere citochine. L'opinione attuale è che le cellule T_H siano in origine precursori cellulari sintetizzanti IL-2. In seguito alla stimolazione iniziale, queste cellule si trasformano in cellule T_{H0} , le quali hanno la capacità di secernere diverse citochine, compresi l'IFN-g, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 e l'IL-10. A seconda della citochina disponibile, le cellule T_{H0} possono trasformarsi in cellule T_{H1} oppure in cellule T_{H2} ; l'IFN-g e l'IL-12 promuovono lo sviluppo delle $T_H 1$ e l'IL-4 e l'IL-10 quello delle T_H2 . I linfociti T_{H1} e T_{H2} differiscono tra loro per il profilo delle citochine che secernono: le cellule T_{H1} secernono IFN-g, mentre le cellule T_{H2} secernono IL-4, anche se entrambe producono diverse altre citochine (es. IL-3, GM-LCR, TNF-a) in maniera equivalente. In generale, i linfociti T_{H1} favoriscono l'attivazione dell'immunità cellulare, mentre i linfociti T_{H2} favoriscono quella dell'immunità umorale.

L'identificazione delle risposte T_{H1} e T_{H2} ha modificato il modo di considerare le relazioni tra il sistema immunitario e le malattie. Una risposta immunitaria deve essere non solo energica, ma anche appropriata all'infezione o alla malattia. Forse il miglior esempio di questa strategia è rappresentato dalla lebbra, nella quale si ritiene attualmente che una risposta T_{H1} dia luogo alla lebbra tubercoloide e una risposta T_{H2} dia luogo alla lebbra lepromatosa. In aggiunta, una risposta T_{H1} può aggravare le patologie autoimmuni, mentre una risposta T_{H2} favorisce la secrezione di IgE e lo sviluppo di atopia.

Cellule T suppressor/citotossiche

Le cellule T che esprimono il CD8 sono meno ben caratterizzate rispetto ai sottotipi T_H , nonostante sembri che anch'esse possano essere suddivise in due sottotipi sulla base delle citochine che secernono, con criterio identico a quello dei sottotipi dei CD4. È stato suggerito che i sottotipi linfocitari vengano chiamati tipo 1 e tipo 2 (T_1 e T_2) piuttosto che T_{H1} e T_{H2} , perché la medesima suddivisione si può osservare nelle cellule CD8.

Le cellule T citotossiche (T_C) sono linfociti T citotossici (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL, v. oltre) Ag-specifici con restrizione MHC. Sia le cellule CD4 sia le cellule CD8 possono fungere da CTL, a seconda del rispettivo riconoscimento del MHC di classe II o di classe I. Si conoscono diversi altri tipi di cellule citotossiche o killer, ma solo alcune di esse esprimono i marker CD8 o CD4.

Cellule killer

L'identificazione di ciascun tipo di cellula killer (tra i diversi possibili) dipende dalla restrizione MHC, dalla necessità di sensibilizzazione, dal tipo di bersaglio e dalla risposta alle citochine. Sebbene i macrofagi possano essere citotossici, tale tossicità è aspecifica ed è il risultato della loro attivazione da parte di alcune citochine. I vari tipi di cellule killer possono essere fundamentalmente divisi in cellule con restrizione MHC (es. i CTL) e cellule senza restrizione MHC (es. le cellule NK). Nessuno dei due tipi richiede Ac, complemento o fagocitosi per eliminare le cellule bersaglio;

al contrario, esse trasmettono il segnale litico attraverso la membrana della cellula bersaglio dopo aver stabilito con essa un intimo contatto intercellulare.

Cellule killer con restrizione MHC: i linfociti T citotossici (CTL) sono cellule killer generate unicamente in seguito a sensibilizzazione specifica nei confronti di cellule che esprimono prodotti MHC estranei (CTL alloigenici) oppure nei confronti di cellule autologhe che siano state modificate da un'infezione virale o da un aptene chimico (CTL singenici). La vita di un CTL attraversa 3 fasi: una cellula precursore può divenire citotossica in seguito a uno stimolo appropriato; questa cellula effettrice è una cellula differenziata che può indurre la lisi del suo bersaglio specifico; una cellula di memoria, quiescente e non ulteriormente stimolata, è pronta a divenire effettrice in seguito a una nuova stimolazione con le cellule originali. Le cellule intatte costituiscono gli stimoli più potenti per la generazione dei CTL; gli Ag solubili sono inefficaci, eccetto in determinate condizioni. Come è stato descritto in precedenza, l'Ag viene processato e un suo frammento viene incorporato all'interno del sito per la presentazione dell'Ag del MHC. Oggi è possibile identificare i peptidi che possiedono una configurazione sterica perfettamente complementare a quella di diversi aplotipi MHC. Se per la stimolazione vengono utilizzati questi peptidi, essi possono essere incorporati all'interno del MHC e stimolare in tal modo una risposta T-cellulare.

I **CTL alloigenici** possono essere facilmente prodotti in vitro coltivando linfociti normali in presenza di cellule stimolatrici alloigeniche irradiate che presentano modificazioni a carico di una parte o di tutta la barriera MHC. I CTL alloigenici possono inoltre essere prodotti in vivo in seguito al trapianto di un organo proveniente da un donatore i cui prodotti MHC sono diversi da quelli del ricevente e probabilmente svolgono un ruolo importante nel rigetto dei trapianti. Perché la produzione di CTL abbia successo sono necessari due segnali: il segnale antigenico (cellule stimolatrici) e il segnale di amplificazione (citochine). Un'azione efficace di questi due segnali richiede la presenza delle APC, dei T_H e dei precursori dei T_C . Il segnale di amplificazione è mediato da citochine che agiscono in tandem; le più importanti sono l'IL-1, l'IL-2 e l'IL-4, ma si ritiene che altre citochine (comprese l'IL-6, l'IL-7, l'IL-10 e l'IL-12) siano coinvolte nella generazione dei CTL, almeno in vitro.

Un altro tipo di CTL che è importante per l'eliminazione di taluni patogeni intracellulari (specialmente le cellule infettate da virus) è costituito dai cosiddetti CTL Ag-specifici (**CTL singenici**). I CTL singenici riconoscono esclusivamente le cellule bersaglio che esprimono l'Ag utilizzato per la sensibilizzazione in associazione con il MHC. Tali CTL vengono generati contro cellule autologhe che siano state "modificate" da infezioni virali o apteni chimici. L'espressione di prodotti virali o di apteni, sulla superficie cellulare in associazione con il MHC innesca una cascata di eventi differenziativi cellulari e di rilascio e risposta citochinica analoghi a quelli dei CTL alloigenici. Sia i CTL alloigenici sia quelli singenici adoperano il complesso TCR/CD3 per il riconoscimento della cellula bersaglio.

Cellule killer senza restrizione MHC: al contrario dei CTL, le **cellule natural killer (NK)** non hanno bisogno di sensibilizzazione per esprimere la loro funzione killer. Le cellule NK costituiscono dal 5 al 30% dei linfociti del sangue periferico normale. Esse sono linfociti, ma non appartengono alle linee cellulari T o B: di conseguenza, le cellule NK non esprimono sIg o TCR/CD3 sulla loro superficie. Il pattern dei marker di superficie che caratterizza meglio queste cellule è $CD2^+$, $CD3^-$, $CD4^-$ e $CD56^+$, con una sottopopolazione che risulta $CD8^+$. Il compito delle cellule NK è l'eliminazione di determinate cellule tumorali autologhe, alloigeniche e anche xenogeniche, indipendentemente dal fatto se questi bersagli esprimano il MHC; in effetti, è possibile che esse eliminino preferenzialmente le cellule bersaglio che esprimono poco o nulla il MHC di classe I. La suscettibilità alla lisi da parte delle cellule NK può essere ridotta se la cellula

bersaglio viene stimolata a incrementare l'espressione del suo MHC (es. tramite trasfezione o IFN).

Questa apparente inibizione dell'attività litica NK indotta dall'espressione del MHC di classe I ha portato all'identificazione di diversi recettori per questa classe sulla superficie delle cellule NK. Questi recettori sono strutturalmente differenti dal TCR e vengono generalmente denominati recettori inibitori delle cellule killer (Killer cell Inhibitory Receptors, KIR). Mentre l'interazione del MHC con il TCR presente sulla membrana delle cellule T conduce all'attivazione della cellula T, l'interazione del MHC con la maggior parte dei KIR porta all'inibizione dell'attività NK, nonostante esistano alcuni KIR in grado di indurre l'attivazione. I KIR sono stati identificati anche sulle cellule T. Ciò pone un problema interessante: le cellule T possiedono recettori differenti (TCR/CD3 e KIR) per la stessa molecola (il MHC di classe I), ma con effetti opposti. Cosa sia a decidere se una cellula T verrà attivata o inibita non si sa con precisione e il risultato finale può variare a seconda del clone T-cellulare.

Da molto tempo si ritiene che le cellule NK siano importanti nella sorveglianza antitumorale, poiché esse sono in grado di eliminare alcune cellule bersaglio neoplastiche e perché la maggior parte dei tumori non esprime il MHC. Le cellule NK eliminano inoltre alcune cellule infettate da virus e alcuni batteri (es. *Salmonella typhi*). La struttura di riconoscimento dell'Ag delle cellule NK non è stata ancora identificata.

In aggiunta alla loro capacità di killing, le cellule NK possono secernere diverse citochine, in particolare IFN-g e GM-CSF (fattore stimolante le colonie dei granulociti e dei macrofagi). Le cellule NK potrebbero costituire la fonte più potente di IFN-g: mediante la sua secrezione, queste cellule possono esercitare la loro influenza sul sistema immunitario adattativo favorendo la differenziazione dei linfociti T_{H1} e inibendo quella dei T_{H2}.

Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente

Le cellule NK esprimono il CD16, un recettore per la regione Fc delle IgG (v. Struttura degli anticorpi, più avanti), e possono utilizzare questo recettore per mediare un altro tipo di lisi cellulare che non presenta restrizione MHC. La citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (Ab-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC) dipende dalla presenza di Ac che riconoscono una cellula bersaglio (la sua specificità è pertanto dovuta alla specificità dell'Ac). In seguito al legame con il suo Ag, la regione Fc dell'Ac viene esposta e si lega poi al suo recettore sulla cellula NK per formare un ponte molecolare. Una volta formato il ponte, alla cellula bersaglio viene trasmesso un segnale litico ancora non del tutto compreso, il quale ne determina la morte.

Un forma interessante di ADCC è la cosiddetta **ADCC inversa**. Alcune cellule killer, compresi i CTL con restrizione MHC, che esprimono il CD3 sulla loro superficie, possono perdere la loro specificità in presenza di Ac anti-CD3. L'anti-CD3 si unisce al suo ligando sulla superficie della cellula killer, lasciando la sua porzione Fc libera di legarsi a sua volta con le cellule bersaglio che esprimono i recettori per la Fc. Anche in questo caso, una volta che si è formato un ponte, il segnale litico viene trasmesso alla cellula bersaglio che porta la Fc. Alcune forme di ADCC potrebbero rivelarsi utili per colpire le cellule tumorali in vivo, come forma di terapia immunitaria.

Cellule T killer senza restrizione MHC

In aggiunta alle cellule NK CD3- TCR- CD56- , una diversa sottopopolazione è CD3⁺ CD56⁺ e può esprimere il CD2, il CD5 e il CD8. La maggior parte di tali elementi è TCR-gd, sebbene siano stati identificati alcuni cloni TCR-ab. Questa sottopopolazione può mediare una certa attività simil-NK

spontanea e può incrementare tale attività dopo stimolazione con IL-2. Un'altra sottopopolazione di cellule T (CD3⁺ TCR-gd CD4⁻ CD8⁻ CD56⁻ CD16⁻) può avere azione citotossica, sebbene nella maggior parte dei casi si tratti di cloni o linee cellulari. Rimane da chiarire se i linfociti isolati di recente che possiedono questo fenotipo siano dotati di attività citotossica spontanea.

Cellule killer attivate da linfocine

Alcuni linfociti coltivati in presenza di IL-2 si trasformano in potenti cellule killer attivate da linfocine (Lymphokine-Activated Killers, LAK) capaci di eliminare un ampio spettro di cellule bersaglio tumorali, come pure linfociti autologhi che siano stati modificati dalla coltura, da alcuni virus o da apteni. Le cellule LAK vengono considerate un fenomeno funzionale, più che una sottopopolazione linfocitaria specifica. I precursori delle LAK sono eterogenei, ma possono essere divisi in due categorie principali: simil-NK e simil-T. Si ritiene generalmente che le cellule NK classiche costituiscano i principali precursori delle LAK nel sangue periferico, ma ciò potrebbe non essere vero nei tessuti extravascolari.

Test per l'immunità cellulare

La valutazione quantitativa di base dell'immunità cellulare deve comprendere la conta linfocitaria, la conta differenziale delle sottopopolazioni T-cellulari (CD3, CD4, CD8) e la conta delle cellule NK con tecniche di fluorescenza. La valutazione qualitativa comprende i test cutanei di ipersensibilità ritardata (Delayed-Type Hypersensitivity, DTH) e i seguenti test in vitro: (1) proliferazione in risposta ad Ag solubili, ad Ac anti-CD3 e ad allo-Ag; (2) attività litica delle cellule NK sia spontanea sia dopo stimolazione con IL-2 o IFN; (3) capacità di elaborazione delle citochine, con particolare riferimento all'IFN-g, al TNF-a, all'IL-2 e all'IL-4; (4) capacità di generazione di CTL con restrizione MHC. L'esecuzione di indagini ulteriori dipenderà dai risultati di questi test. La valutazione esaustiva dell'immunità cellulare viene effettuata soltanto nei laboratori di ricerca.

I test cutanei di DTH forniscono indicazioni sulla normalità di alcuni aspetti del sistema immunitario cellulare. Tuttavia, essi non valutano lo stato delle cellule CD8, delle cellule CD4 vergini, delle cellule NK e delle APC diverse dalle cellule di Langerhans. Per esempio, un paziente può avere un'assenza completa di cellule NK e presentare ancora una normale DTH. Così, mentre la negatività di un test cutaneo di DTH indica la presenza di un'immunità cellulare anormale, non è vero il contrario.

I test cutanei di DTH devono essere letti a 48 h. Una risposta più precoce potrebbe essere dovuta a una **reazione di Arthus** (che comincia da 4 a 6 h dopo l'esecuzione del test e può essere presente fino a 24 h dopo). Questa reazione è dovuta alla presenza di un Ac che si lega all'Ag iniettato dando origine alla formazione di immunocomplessi, all'attivazione del complemento e alla chemiotassi dei neutrofili. L'infiltrato cellulare di una reazione di Arthus consiste soprattutto di neutrofili, mentre l'infiltrato della DTH è costituito da cellule mononucleate. La risposta di DTH comincia a risolversi dopo 48 h e se si legge il test cutaneo a 72 h una reazione ai limiti inferiori della positività (indurimento > 5 mm) può sembrare falsamente negativa.

RETI IMMUNITARIE

Il sistema immunitario si comporta come un'unità indivisibile e nessuna delle sue componenti agisce in maniera autonoma. In ogni risposta immunitaria, le varie componenti agiscono di concerto, in tandem o in conflitto tra loro, come è esemplificato dalla capacità del sistema

immunitario di eliminare i microrganismi. I microrganismi extracellulari (la maggior parte dei batteri capsulati) per essere digeriti devono solo essere fagocitati; al contrario i microrganismi intracellulari (es. i micobatteri) vengono facilmente ingeriti, ma non possono essere digeriti a meno che il macrofago non riceva un segnale di attivazione.

La strategia per eliminare i microrganismi extracellulari è pertanto orientata alla **fagocitosi**, la quale viene facilitata dall'**opsonizzazione** (rivestimento di un microrganismo con Ac e/o con prodotti del complemento). Poiché la maggior parte dei fagociti possiede recettori per la porzione Fc degli Ac e per i prodotti del C3, la presenza di queste molecole su un batterio facilita la sua adesione e la sua ingestione. Questa risposta immunitaria "semplice" dipende dal buon esito della sintesi di Ac, dall'attivazione della cascata complementare e dall'integrità del sistema fagocitario. Gli Ac vengono prodotti dalle cellule B, tuttavia queste cellule sono soggette all'azione di induzione o di soppressione da parte delle cellule T. In aggiunta, i fagociti vengono richiamati da fattori chemiotattici, alcuni dei quali sono sintetizzati dalle cellule T.

La strategia per eliminare alcuni microrganismi intracellulari che infettano i fagociti prevede l'attivazione delle cellule ospiti, le quali successivamente divengono "armate" e capaci di uccidere questi organismi in maniera aspecifica. La capacità di attivare i macrofagi costituisce il nucleo fondamentale della tipica reazione di ipersensibilità ritardata (DTH) e il test cutaneo di DTH è un esempio eccellente delle diverse cascate di eventi coinvolte in una determinata risposta immunitaria. Il presupposto di un test cutaneo di DTH è che l'iniezione intradermica di un Ag con il quale il paziente sia venuto a contatto in precedenza conduca all'indurimento cutaneo locale entro 48 h. La complessa rete di interazioni implicata in una risposta di questo tipo è illustrata nella Fig. 146-2. In seguito all'iniezione, le cellule di Langerhans della cute captano l'Ag, lo processano e lo presentano (complessato con il MHC di classe II) a una cellula CD4⁺ che era già stata esposta all'Ag in precedenza (cioè una cellula di memoria a lunga sopravvivenza). Appena la cellula CD4⁺ lega il complesso Ag/MHC, essa esprime i recettori per l'IL-2 e rilascia diverse citochine (es. IFN-g, IL-2 e fattori chemiotattici per i linfociti e i macrofagi). L'IFN-g stimola le cellule endoteliali ad aumentare la loro espressione delle molecole di adesione, facilitando così la fuoriuscita dei linfociti e dei macrofagi attraverso la barriera endoteliale. L'IL-2 e l'IFN-g agiscono inoltre come segnali di proliferazione/ differenziazione, consentendo l'espansione dei cloni delle cellule T di memoria e delle cellule T appena reclutate. Dopo che i macrofagi hanno raggiunto la sede di inoculazione, i fattori di inibizione della migrazione (Migration-Inhibiting Factors, MIF) secreti dalle cellule T attivate impediscono loro di allontanarsi. L'IFN-g e il GM-LCR, entrambi secreti dalle cellule T, agiscono successivamente come fattori di attivazione dei macrofagi (Macrophage Activating Factors, MAF). I macrofagi attivati sono ora "armati" e sono in grado di eliminare gli organismi intracellulari e ogni cellula tumorale eventualmente presente.

I macrofagi attivati secernono IL-1 e TNF-a, i quali potenziano la secrezione di IFN-g e di GM-LCR, aumentano l'espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali e permettono a queste cellule di secernere un fattore tissutale che innesca la cascata coagulativa, la quale si conclude con la deposizione di fibrina. Contemporaneamente, i linfociti attivati secernono il fattore inducente la procoagulazione dei macrofagi (Macrophage Procoagulant-Inducing Factor, MPIF), il quale consente l'espressione dell'attività procoagulativa macrofagica (Macrophage ProCoagulant Activity, MPCA). La MPCA attiva inoltre la cascata della coagulazione dando luogo alla deposizione di fibrina. Quest'ultima è responsabile dell'indurimento che si osserva nei test cutanei di DTH.

La via della DTH è importante per l'eliminazione dei microrganismi che infettano i fagociti. Alcuni microrganismi (es. i virus) possono infettare cellule che non possiedono un apparato litico e che quindi non possono essere attivate per mediare il killing intracellulare. Tali patogeni vengono eliminati dai CTL. In caso di infezione da parte di un virus, le cellule esprimono gli Ag virali sulla loro superficie in associazione con il MHC. Questo complesso virus/MHC stimola la formazione di CTL singenici che in seguito distruggono le cellule che lo esprimono. A seconda dell'associazione del prodotto virale con il MHC di classe I o di classe II, i CTL appartengono rispettivamente alle

sottopopolazioni dei CD8 e dei CD4. Come è stato descritto in precedenza, l'associazione con l'una o l'altra classe del MHC dipende dalla via che è stata utilizzata per processare l'Ag; es., la maggior parte dei CTL prodotti contro il virus del morbillo e quello dell'herpes simplex appartiene alla sottopopolazione dei CD4. Durante l'infezione da virus influenzale, i CTL diretti contro l'Ag nucleoproteico sono CD8, mentre quelli diretti contro l'Ag emoagglutinico sono CD4.

ANAFILASSI

Reazione sistemica acuta, spesso a decorso esplosivo, mediata da IgE, che si verifica in un individuo precedentemente sensibilizzato il quale venga a contatto con l'antigene sensibilizzante.

L'anafilassi ha luogo quando l'antigene (proteine, polisaccaridi o apteni coniugati con proteine carrier) raggiunge il torrente circolatorio. Gli antigeni più comunemente responsabili sono gli enzimi introdotti per via parenterale, gli emoderivati, gli antibiotici b-lattamici e molti altri farmaci, gli allergeni usati per l'immunoterapia allergenica (desensibilizzazione) e il veleno degli insetti. I b-bloccanti, anche sotto forma di collirio, possono aggravare le reazioni anafilattiche. L'anafilassi può essere aggravata o anche provocata de novo dall'esercizio fisico e alcuni pazienti accusano sintomi ricorrenti senza una ragione identificabile. Quando l'antigene reagisce con le IgE presenti sulla superficie dei basofili e delle mast-cellule, vengono sintetizzati o rilasciati istamina, leucotrieni e altri mediatori. Questi mediatori provocano la contrazione della muscolatura liscia (responsabile della dispnea e della sintomatologia GI) e la vasodilatazione che caratterizzano l'anafilassi. La vasodilatazione e la fuoriuscita di plasma nei tessuti sono responsabili dell'orticaria e dell'angioedema e provocano una riduzione del volume plasmatico efficace, che rappresenta la causa principale dello shock. Il liquido penetra anche negli alveoli polmonari e può provocare edema polmonare. Può anche verificarsi un angioedema ostruttivo delle vie aeree superiori. Se la reazione è prolungata, possono svilupparsi aritmie e shock cardiogeno.

Le **reazioni anafilattoidi** sono clinicamente simili all'anafilassi, ma possono verificarsi già dopo la *prima* iniezione di taluni farmaci (polimixina, pentamidina, oppioidi) e mezzi di contrasto. Esse hanno alla base un meccanismo tossico-idiosincrasico dose-dipendente, più che un meccanismo mediato immunologicamente. L'aspirina e altri FANS possono provocare reazioni nei pazienti suscettibili.

Sintomi e segni

La sintomatologia è variabile e raramente un singolo paziente sviluppa il quadro clinico completo. Tipicamente, nel volgere di 1-15 min (ma raramente anche dopo 2 h) il paziente è irrequieto, agitato e arrossato con palpitazioni, parestesie, prurito, pulsazioni auricolari, tosse, starnutazione, orticaria e angioedema, oltre a difficoltà di respirazione dovuta a edema laringeo o a broncospasmo. Nausea, vomito, dolore addominale e diarrea sono meno comuni. Entro i successivi 1-2 min può manifestarsi uno shock e il paziente può avere convulsioni, perdere il controllo degli sfinteri, divenire areattivo e morire. Può verificarsi un collasso cardiocircolatorio primitivo in assenza di sintomatologia respiratoria. Gli episodi ricorrenti di anafilassi che si presentano nello stesso individuo sono solitamente caratterizzati dai medesimi sintomi.