

## BIOLOGIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

### 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 linfoidei. 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 (p. 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 (p. es. i CTL) e cellule senza restrizione MHC (p. 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

allogenic. 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<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup> e CD56<sup>+</sup>, con una sottopopolazione che risulta CD8<sup>+</sup>. 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 (p. es. tramite transfezione 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 (p. es. la *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- $\gamma$  e GM-CSF (fattore stimolante le colonie dei granulociti e dei macrofagi). Le cellule NK potrebbero costituire la fonte più potente di IFN- $\gamma$ : mediante la sua secrezione, queste cellule possono esercitare la loro influenza sul sistema immunitario adattativo favorendo la differenziazione dei linfociti T<sub>H1</sub> e inibendo quella dei T<sub>H2</sub>.

### **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<sup>-</sup> TCR<sup>-</sup> CD56<sup>-</sup>, una diversa sottopopolazione è CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> TCR-gd CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD56<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup>) 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 (v. [Reti immunitarie](#), più avanti).

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.

## CELLULE T E IMMUNITA' CELLULARE

### 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 (p. 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<sup>+</sup> che era già stata esposta all'Ag in precedenza (cioè una cellula di memoria a lunga sopravvivenza). Appena la cellula CD4<sup>+</sup> lega il complesso Ag/MHC, essa esprime i recettori per l'IL-2 e rilascia diverse citochine (p. es. IFN- $\gamma$ , IL-2 e fattori chemiotattici per i linfociti e i macrofagi). L'IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\alpha$ , i quali potenziano la secrezione di IFN- $\gamma$  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 (p. 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; p. 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.