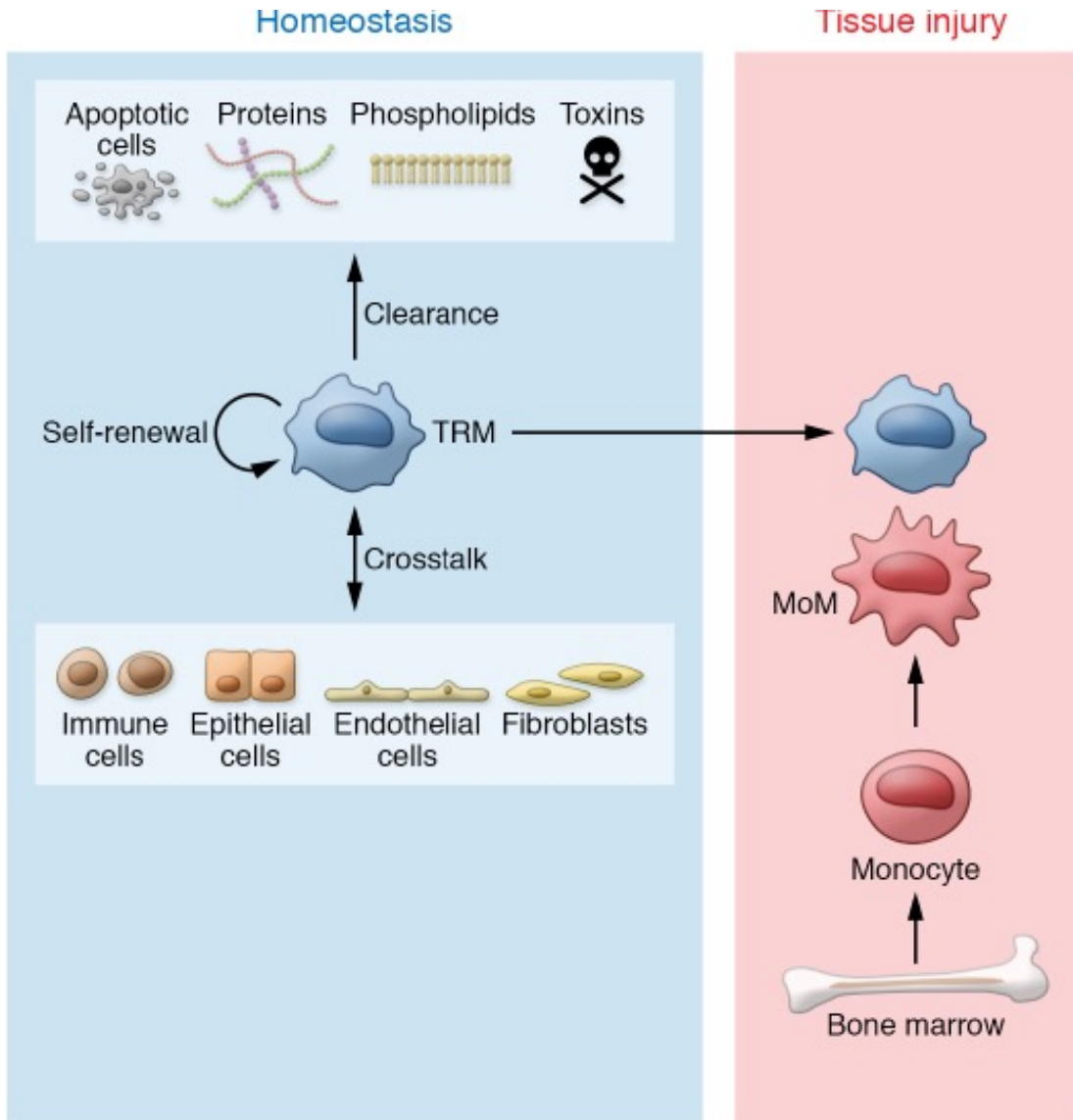


I macrofagi residenti nei tessuti e derivati dai monociti



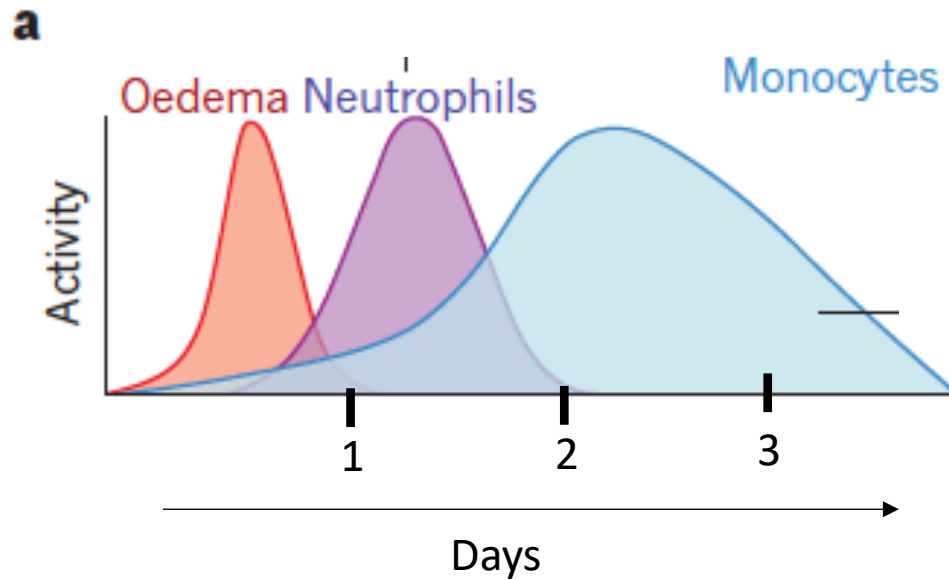
I macrofagi nei tessuti possono essere distinti in macrofagi residenti nei tessuti e macrofagi derivati dai monociti.

Durante il processo infiammatorio i macrofagi nel tessuto interessato derivano dal differenziamento dei monociti.

Durante il processo infiammatorio si osserva un aumento sia dei macrofagi che risiedono nel tessuto o che derivano dai monociti.

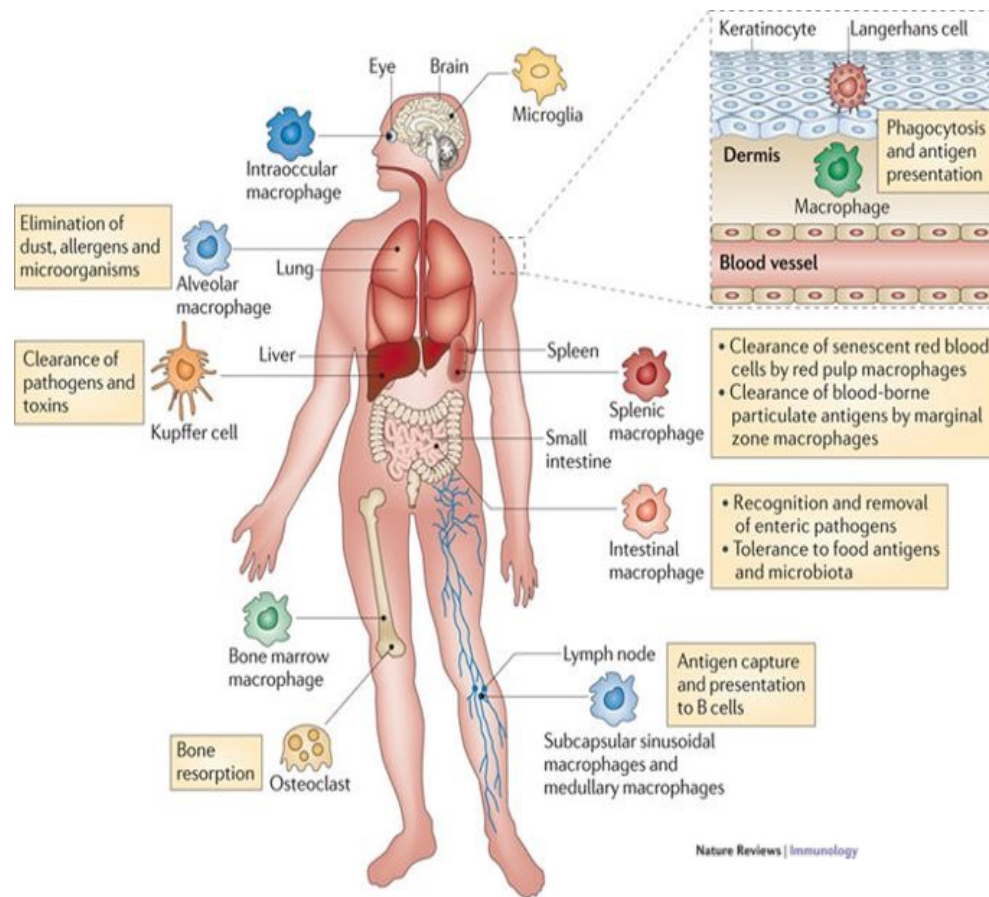
TRM= tissue resident macrophages, MoM= monocyte derived macrophages

Infiltrati leucocitari nell'inflammatione acuta



Nel processo infiammatorio acuto i neutrofili rappresentano la componente cellulare che per prima infila il tessuto (6-24 ore). Successivamente i neutrofili sono sostituiti dai monociti (24-48 ore).

Distribuzione tissutale dei macrofagi



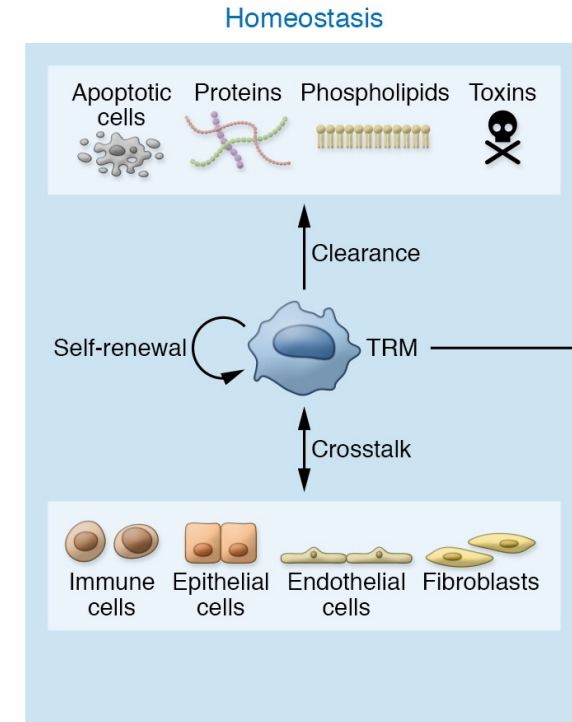
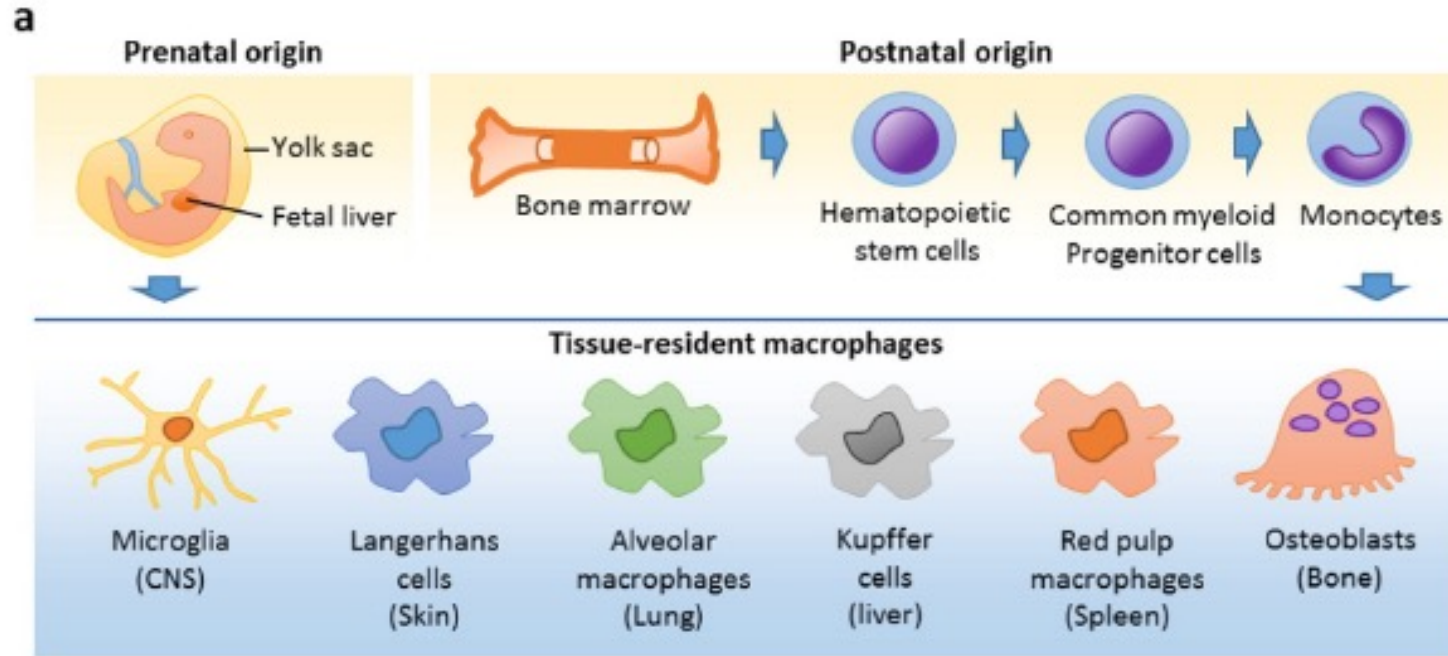
I macrofagi residenti nei diversi tessuti includono gli **osteoclasti** (osso), i **macrofagi alveolari** (polmone), gli **istiociti** (tessuto connettivo) le **cellule di Kupffer** (fegato). L'intestino è popolato da diversi tipi di macrofagi che insieme alle cellule dendritiche mantengono la tolleranza alla flora intestinale e agli alimenti. Popolazioni distinte di macrofagi popolano gli organi immuno-privilegiati come il cervello (**microglia**), l'occhio e i testicoli

I macrofagi

1) residenti nei diversi tessuti mantengono l'equilibrio dei tessuti.

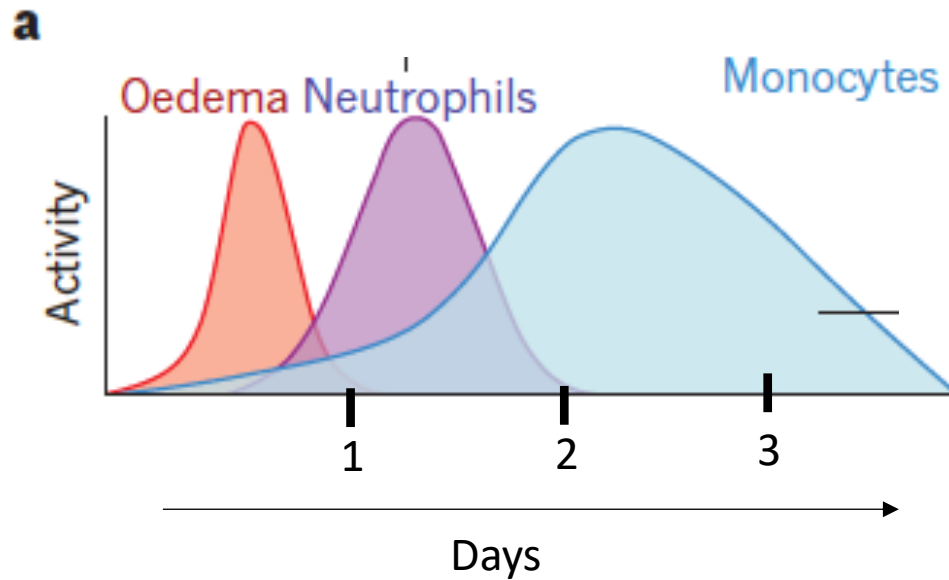
2) agiscono da sentinelle delle infezioni e del danno tissutale ingerendo le sostanze estranee e attivando la risposta infiammatoria che media il reclutamento di altre cellule quali i monociti e i neutrofili.

Origine dei macrofagi tissutali



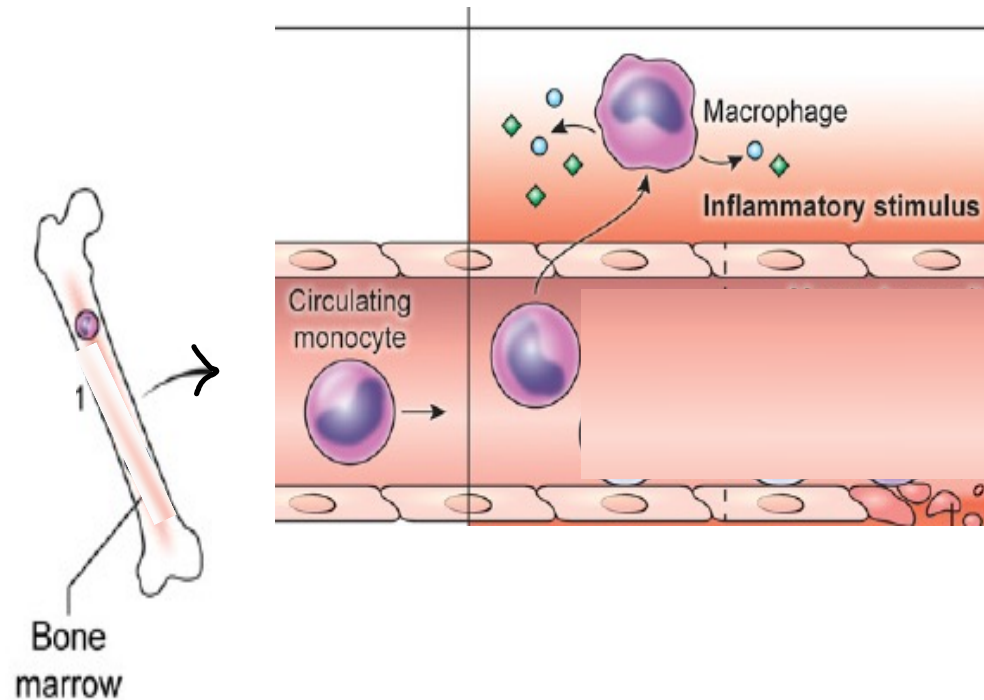
In molti tessuti i macrofagi originano da precursori cellulari che derivano dal sacco vitellino o dal fegato fetale e differenziano in macrofagi come parte dello sviluppo prenatale. Questi macrofagi residenti nel tessuto possono avere una vita molto lunga (mesi nel cervello, fegato, polmone e pelle) e possono autorinnovarsi mantenendo il loro pool cellulare senza un contributo da parte dei monociti. In altri tessuti quali ad esempio l'intestino i macrofagi che si autorinnovano coesistono con i macrofagi che derivano dai monociti.

Infiltrati leucocitari nell'inflammatione acuta



Nel processo infiammatorio acuto i neutrofili rappresentano la componente cellulare che per prima infila il tessuto (6-24 ore). Successivamente i neutrofili sono sostituiti dai monociti (24-48 ore).

Reclutamento dei monociti nel sito leso

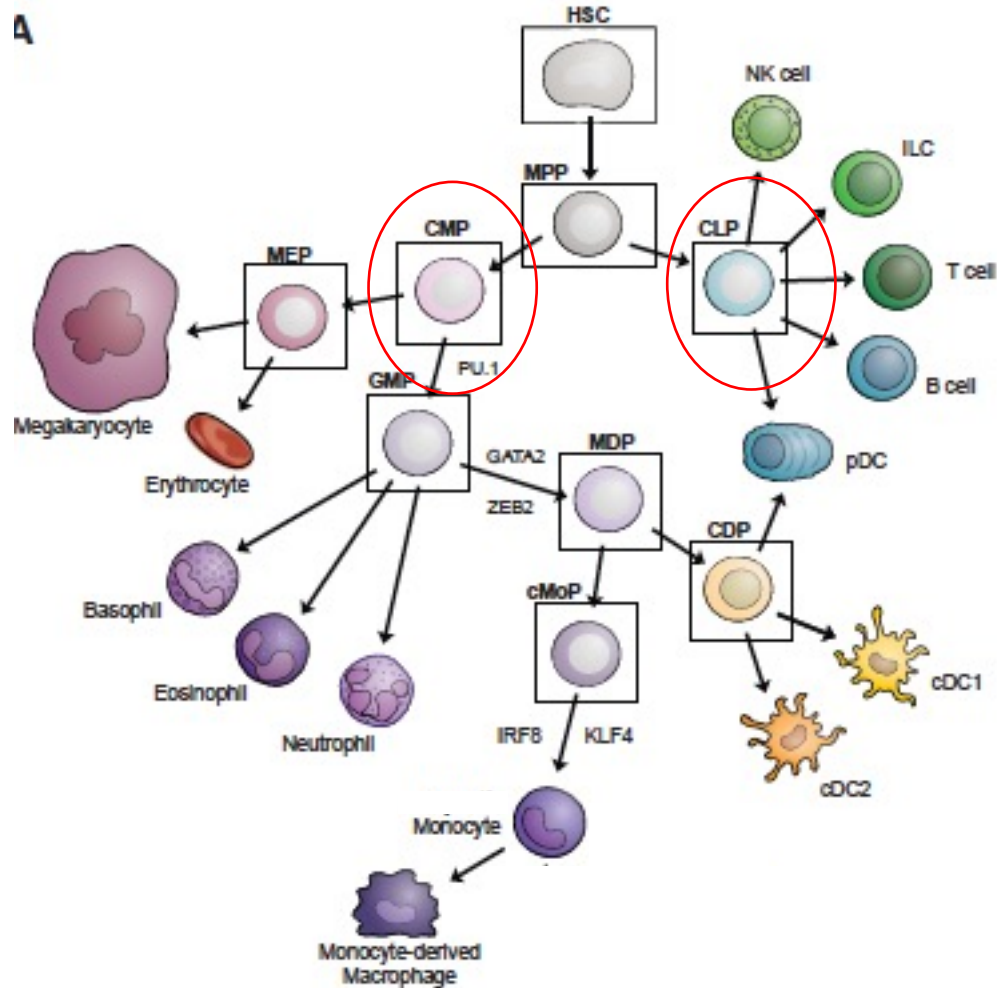


Durante l'induzione della risposta infiammatoria acuta i monociti vengono reclutati dal circolo sanguigno e raggiungono i siti di infiammazione richiamati dalla chemochina CCL2.

Tale chemochina è prodotta dai macrofagi, monociti, fibroblasti e cellule epiteliali.

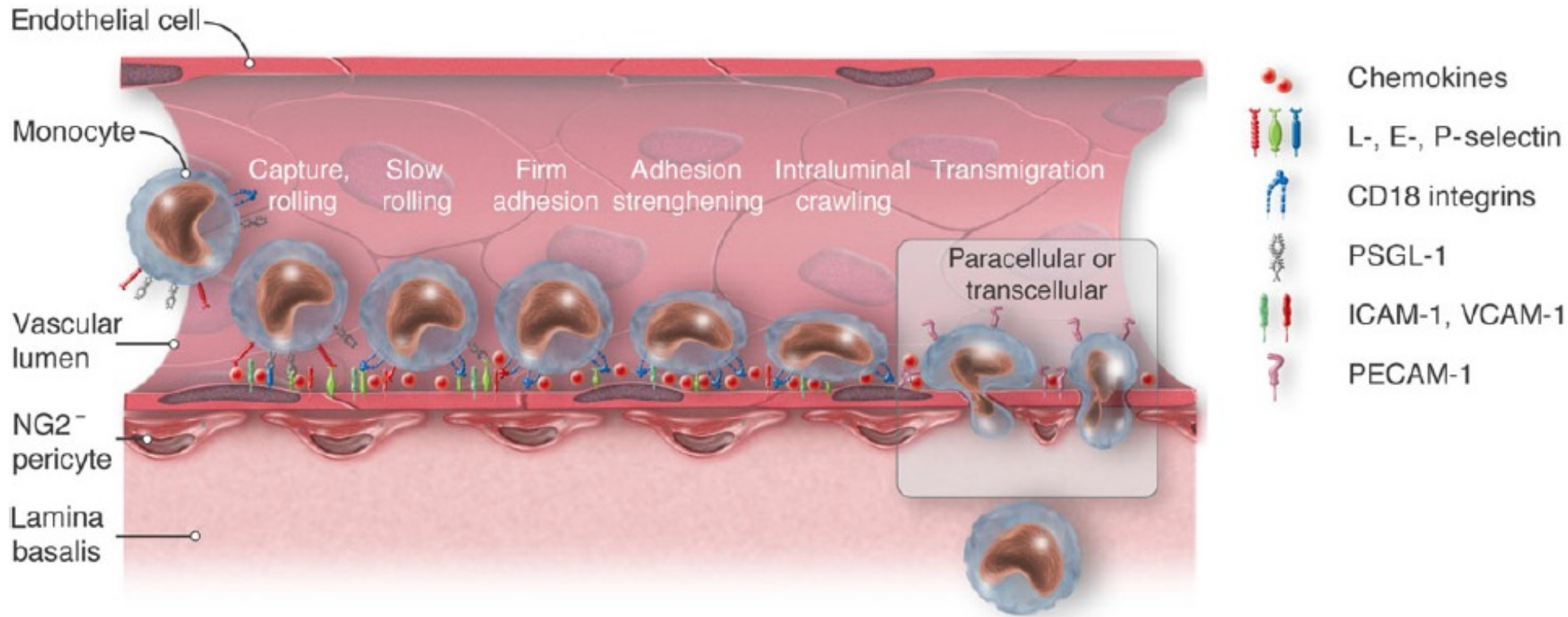
I monociti sono caratterizzati dalla capacità di fagocitare, produrre specie reattive dell'ossigeno e molecole pro-infiammatorie quali l'IL-6, TNF- α , CCL2.

Sviluppo dei monociti



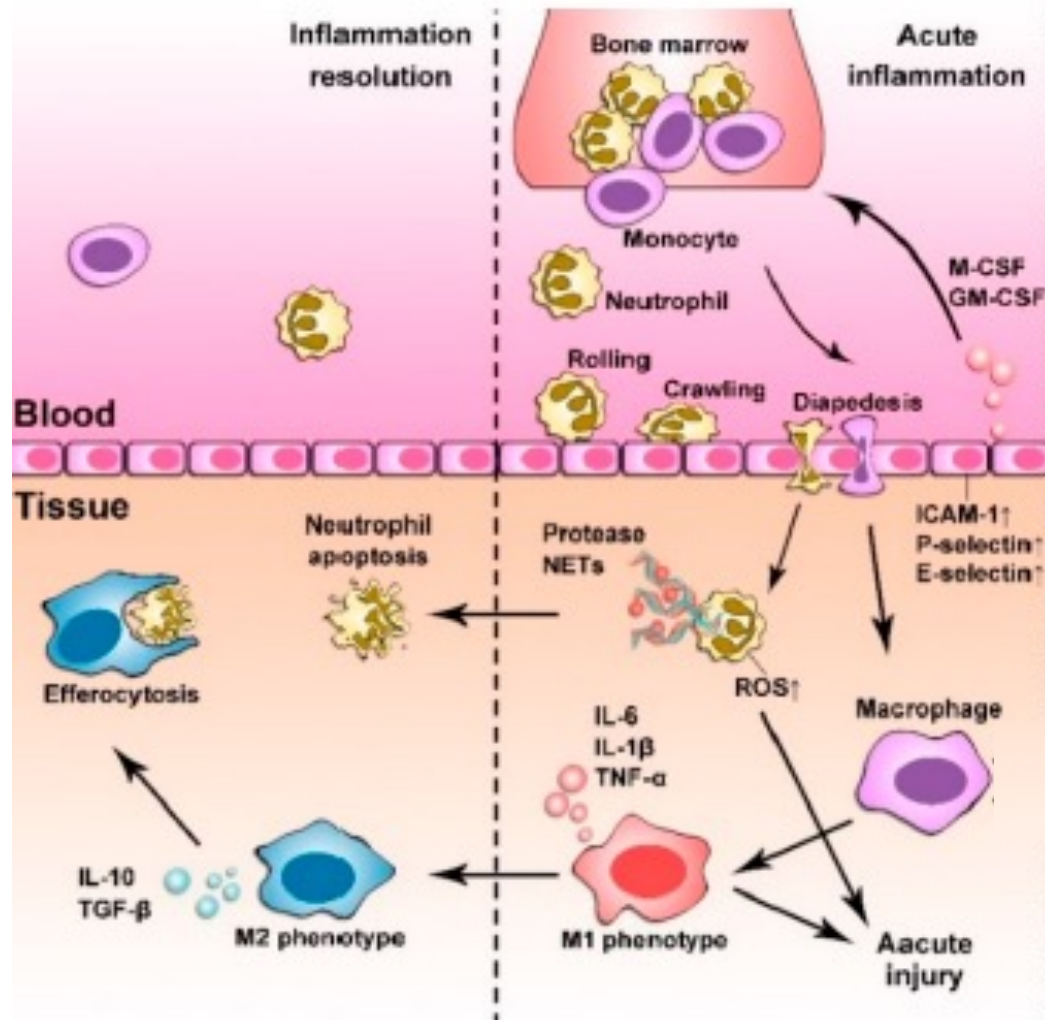
Sviluppo delle cellule del sangue nel midollo osseo: A partire dalle cellule staminali ematopoietiche (HSC), i precursori multipotenti (MPP) danno origine attraverso precursori intermedi a tutte le cellule del sangue. I precursori dei granulociti e dei macrofagi (GMP) producono i granulociti o differenziano ulteriormente nel precursore dei monociti/cellule dendritiche. Tale precursore darà origine al precursore dei monociti e al precursore delle cellule dendritiche.

Extravasazione dei monociti



Nella extravasazione dei monociti l'interazione fra il PSGL-1 espresso dai monociti con le P- e E- selettine media l'adesione debole e il rolling. L'adesione forte è mediata dall'interazione delle integrine LFA1 (lymphocyte function associated antigen) con ICAM-1 e VLA-4 (very late antigen 4) con il V-CAM1 e dalla chemochina CCL2 che lega il recettore CCR2. Il crawling dipende da LFA1, Mac1 e ICAM-1 e ICAM-2.

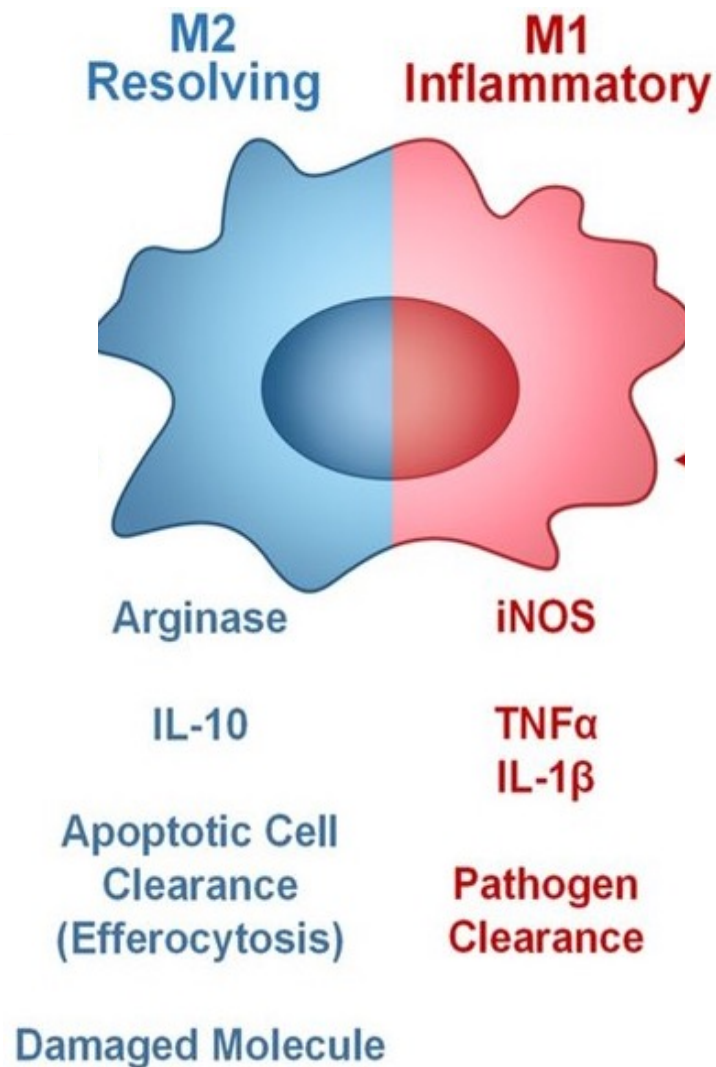
Plasticità dei macrofagi



I macrofagi sono cellule plastiche e possono andare incontro a due diversi differenziamenti. I macrofagi polarizzati M1 producono citochine pro-infiammatorie e chemochine. I macrofagi M1 nel corso dell'inflammazione sono sostituiti dai macrofagi che promuovono la guarigione delle ferite e definiti M2.

Macrofagi M1 e M2

I macrofagi sono cellule plastiche che adottano diversi stati di attivazione a seconda dell'ambiente in cui si trovano. Durante l'invasione da parte di patogeni i macrofagi adottano un fenotipo "infiammatorio" o "attivato" **M1**. Queste cellule sono comunemente definite classicamente attivate (CAMs). Questa attivazione è stata la prima ad essere descritta. I macrofagi possono essere attivati classicamente o dall'IFN- γ o dalla stimolazione dei Toll like receptor. Tali stimoli determinano la secrezione di citochine pro-infiammatorie quali l'IL-1, il TNF- α , l'IL-6.



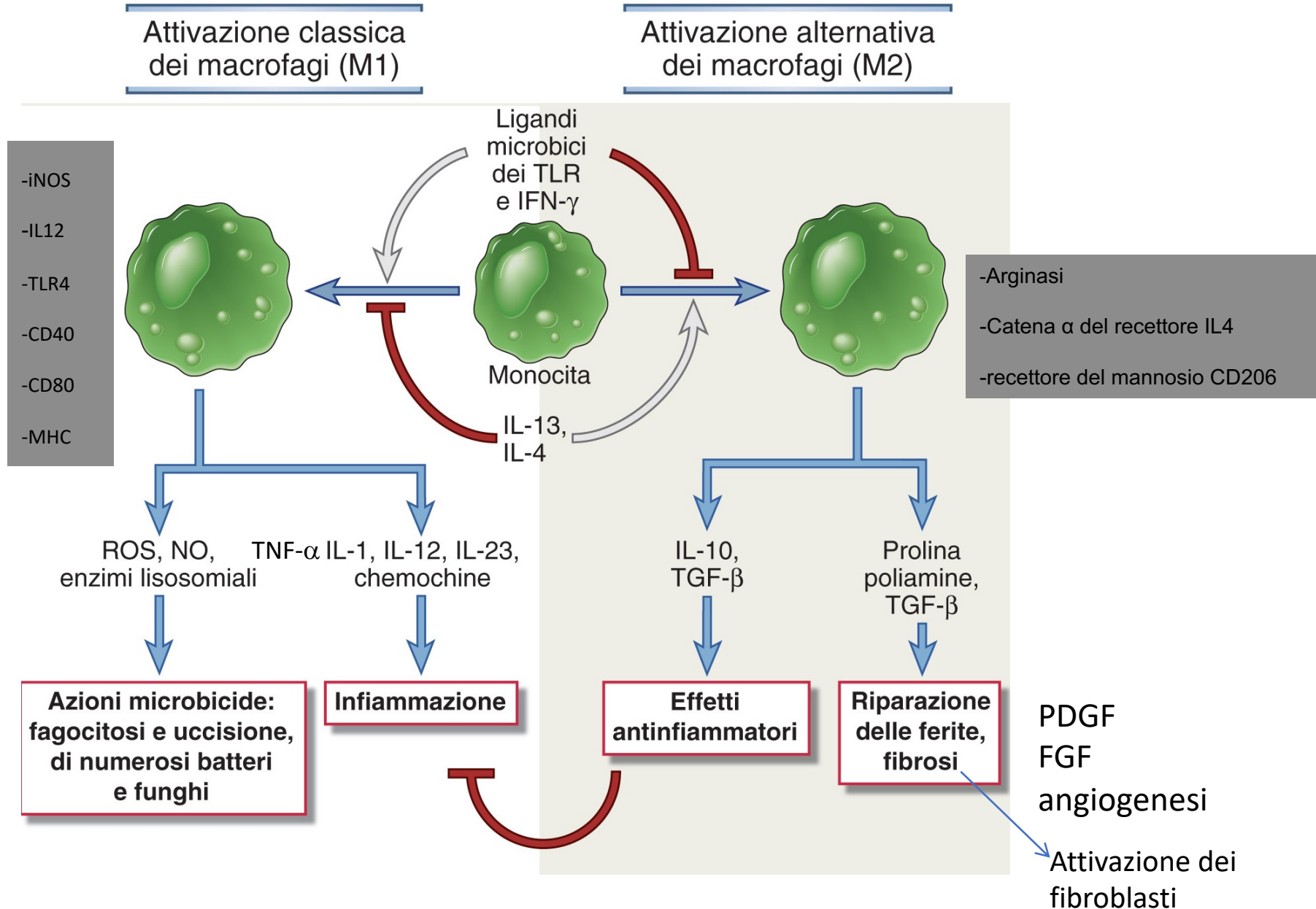
Le citochine come l'IL-4 e l'IL-13 inducono lo stato "alternativo" di attivazione dei macrofagi (AAM) che si associa al riparo del tessuto, e a funzioni immunoregolatorie.

Tali citochine attivano i macrofagi con funzioni pro-angiogeniche, pro-fibrotiche. Tali macrofagi producono il PDGF, il TGF- β , VEGF e diverse metalloproteasi che regolano l'attivazione dei miofibroblasti e la deposizione di componenti della matrice extracellulare (collagene).

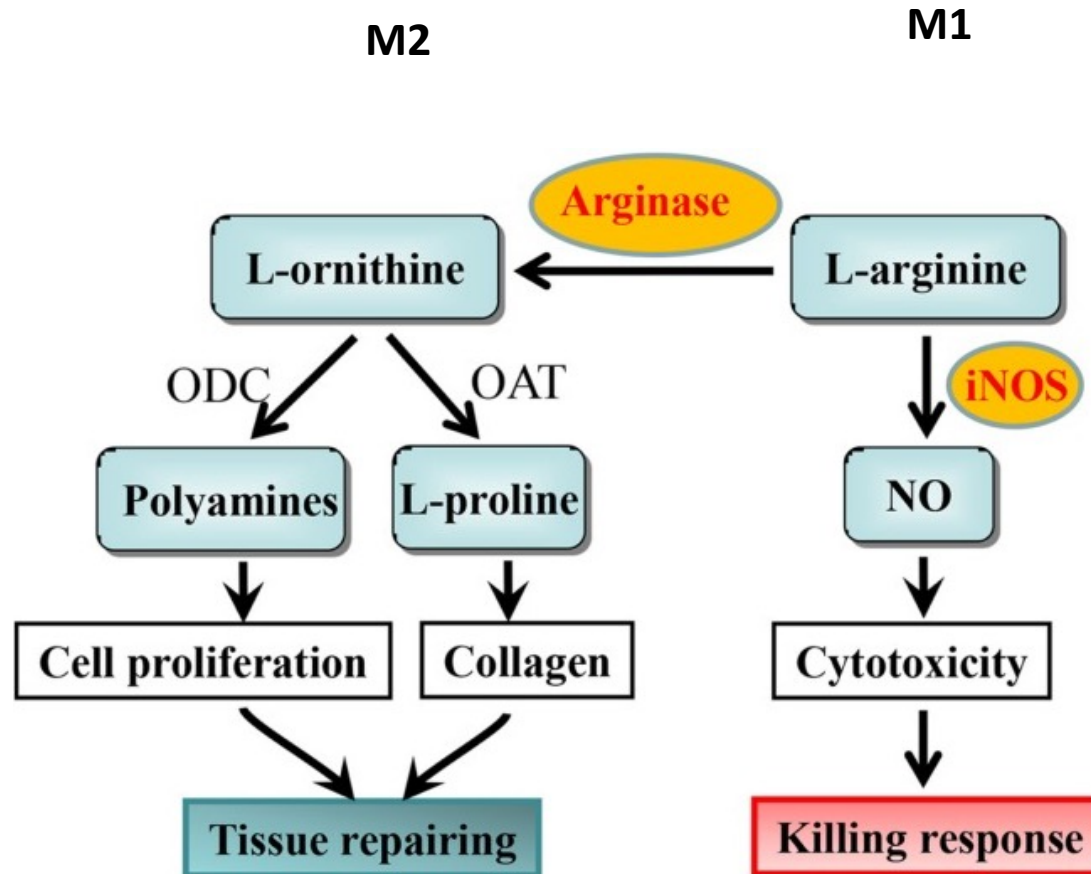
I macrofagi alternativamente attivati (**M2**) producono anche proteine ad attività immunoregolatoria quali: l'arginasi 1, l'IL-10. Per questo diversamente dai CAMs gli AAMs sono coinvolti nella soppressione della risposta immune e nella risoluzione della risposta infiammatoria.

L'attivazione dei macrofagi con attività immunoregolatoria è indotta anche da stimoli quali la fagocitosi di cellule apoptotiche, il microambiente tumorale.

Attivazione dei macrofagi: classica o alternativa

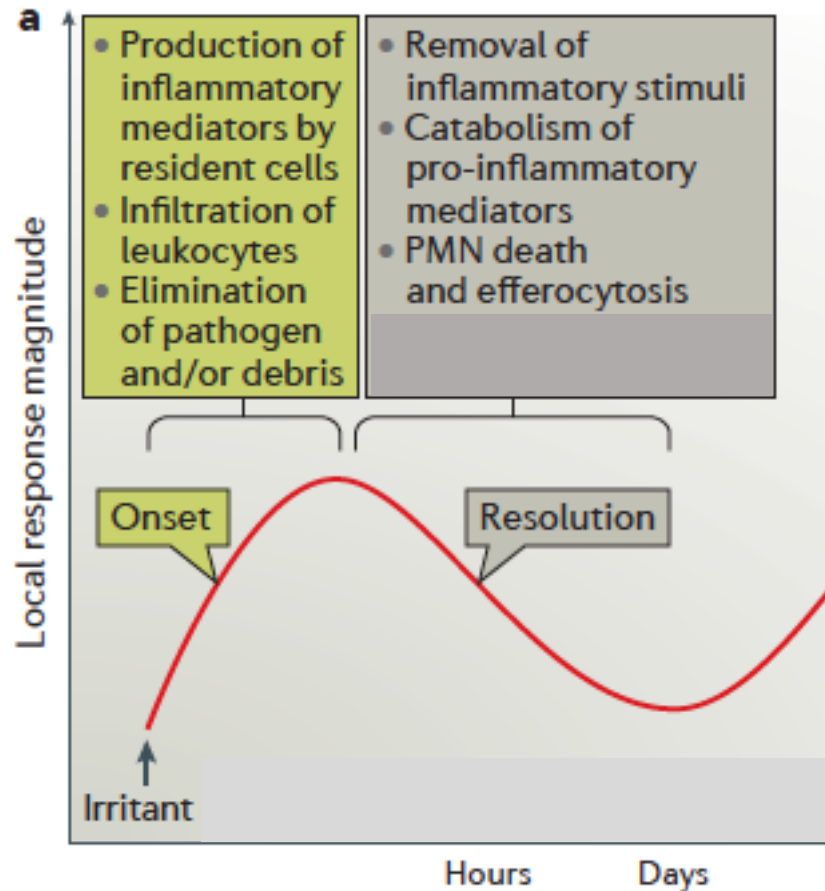


Metabolismo dell'arginina nei macrofagi M1 e M2



L'arginasi idrolizza l'arginina in ornitina e urea. L'ornitina viene utilizzata per la sintesi di prolina e poliamine necessarie per la sintesi di collagene e per la proliferazione cellulare.

Risoluzione dell'infiammazione



Il periodo fra il picco dell'influsso delle cellule infiammatorie nel sito lesivo e l'eliminazione di tali cellule fino al ripristino dell'equilibrio funzionale viene definito risoluzione.

La risoluzione avviene attraverso una serie di processi che includono:

- L'eliminazione dell'agente lesivo che ha causato l'infiammazione.
- L'arresto della produzione dei mediatori pro-infiammatori e la degradazione dei pre-esistenti
- L'eliminazione dei leucociti reclutati mediata dai macrofagi (efferocitosi)
- L'eliminazione dei macrofagi derivati dai monociti dal tessuto

Onset of inflammation

Production of inflammatory mediators

Neutrophil recruitment

Increased neutrophil lifespan

Classical activated macrophages

Onset of resolution

Chemokine depletion

Lipid mediator class switch

***De novo* AnxA1 synthesis**

Down regulation of proinflammatory cytokines

Meccanismi di deplezione delle chemochine

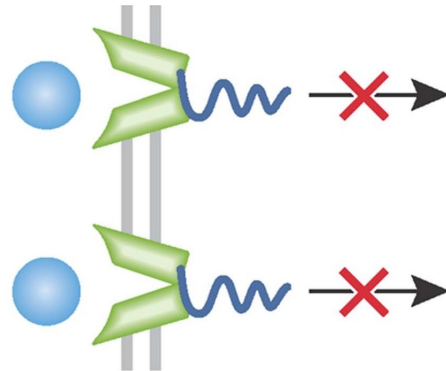
Chemokine truncation



Chemokine sequestration

Structural decoy receptors

D6, DARC



I diversi meccanismi di deplezione delle chemochine includono:

- il taglio proteolitico delle chemochine da parte della metalloproteasi MMP12 espressa dai macrofagi
- il legame con recettori atipici (decoy receptor) in grado di legare la chemochina senza innescare la via di segnalazione intracellulare.

L'apoptosi dei neutrofili è centrale nella risoluzione dell'infiammazione

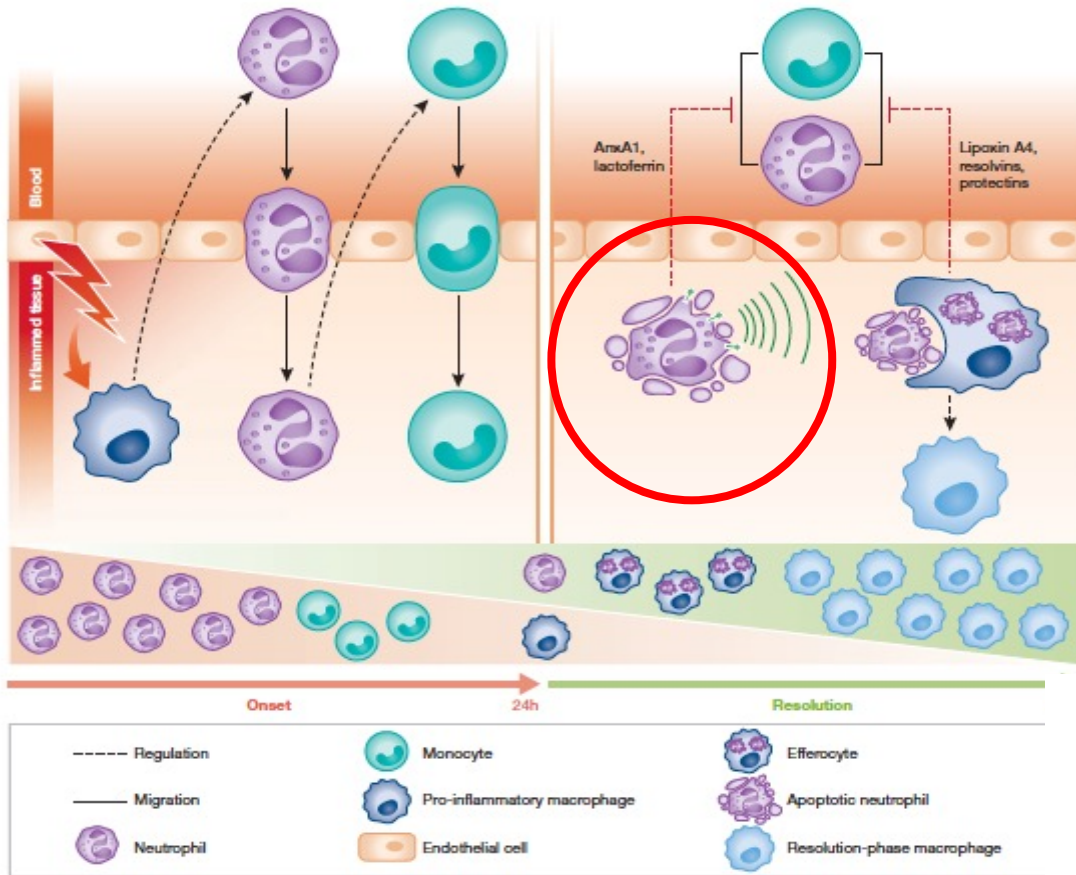
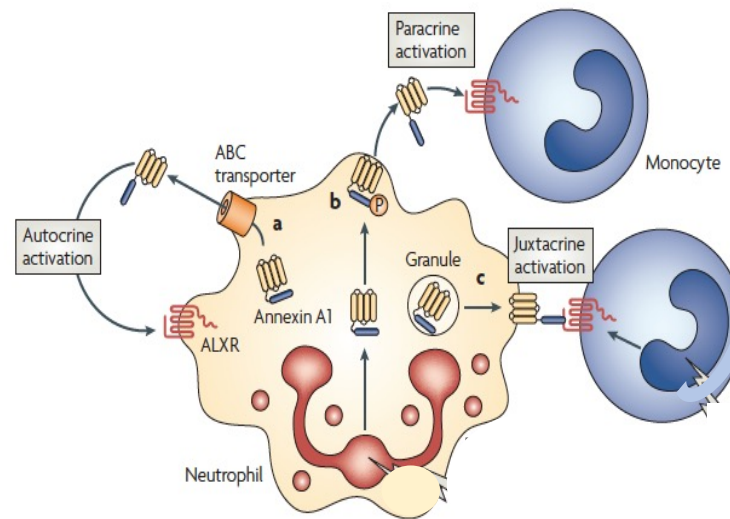


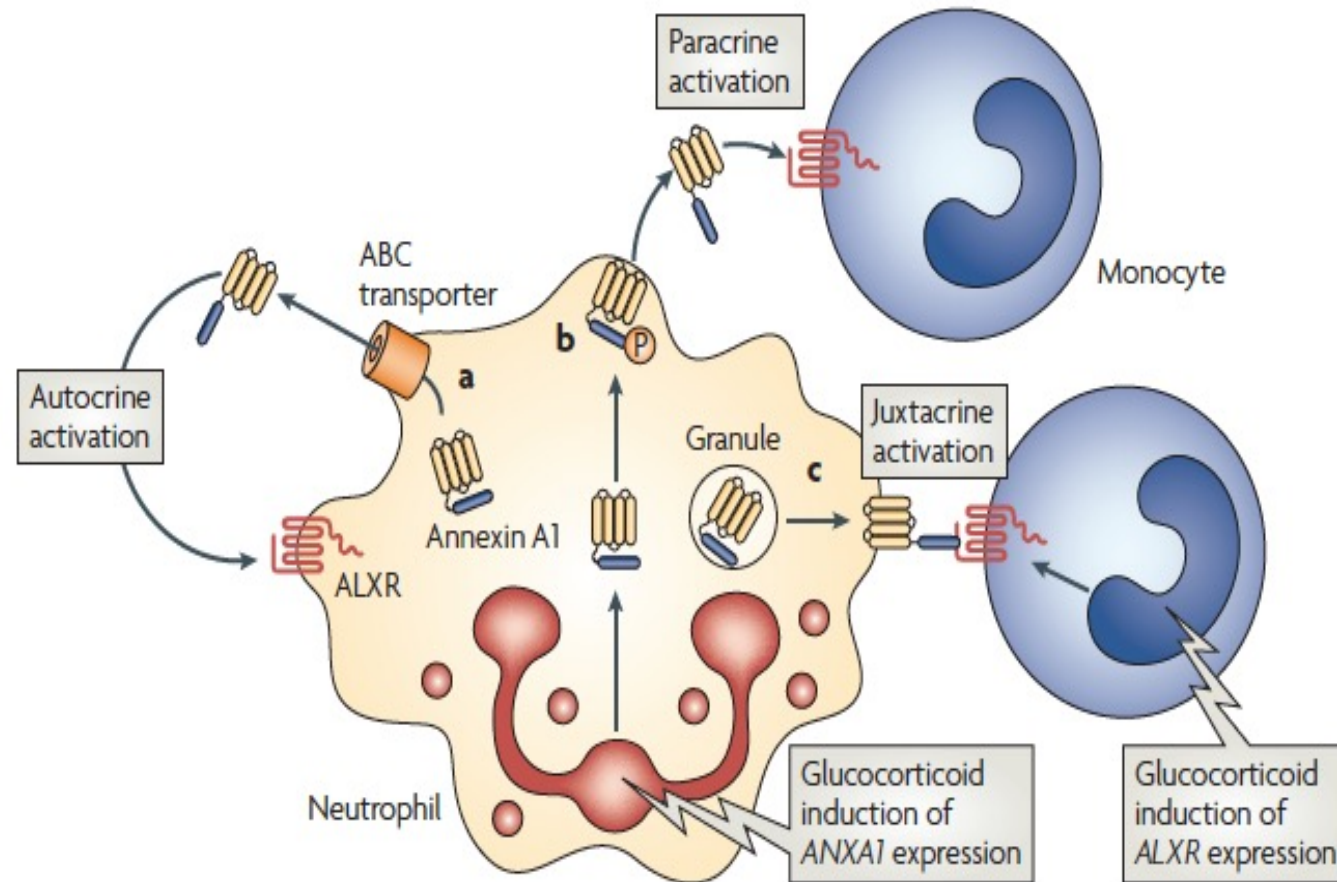
Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation. Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of apoptotic neutrophils changes the macrophage phenotype towards a resolution-phase macrophage, which promotes return to tissue homeostasis. A switch in tissue (stromal) cells can also contribute to generate the initial signals for resolution to start.

La risoluzione dell'infiammazione ha inizio quando i neutrofili diventano apoptotici.

I neutrofili attenuano l'infiammazione attraverso diversi meccanismi che includono:

- Secrezione di mediatori che inibiscono il reclutamento dei leucociti es: Annexin A1 (AnXA1) . AnXA1 è un proteina citosolica che nei neutrofili attivati trasloca sulla membrana plasmatica dove interagisce con il suo recettore FPR2/ALX (formil peptide receptor 2). La proteina può anche essere secreta e agire in modo paracrino. Sui neutrofili agisce bloccando la transmigrazione nei tessuti.
- Produzione di mediatori lipidici ad attività anti-infiammatoria

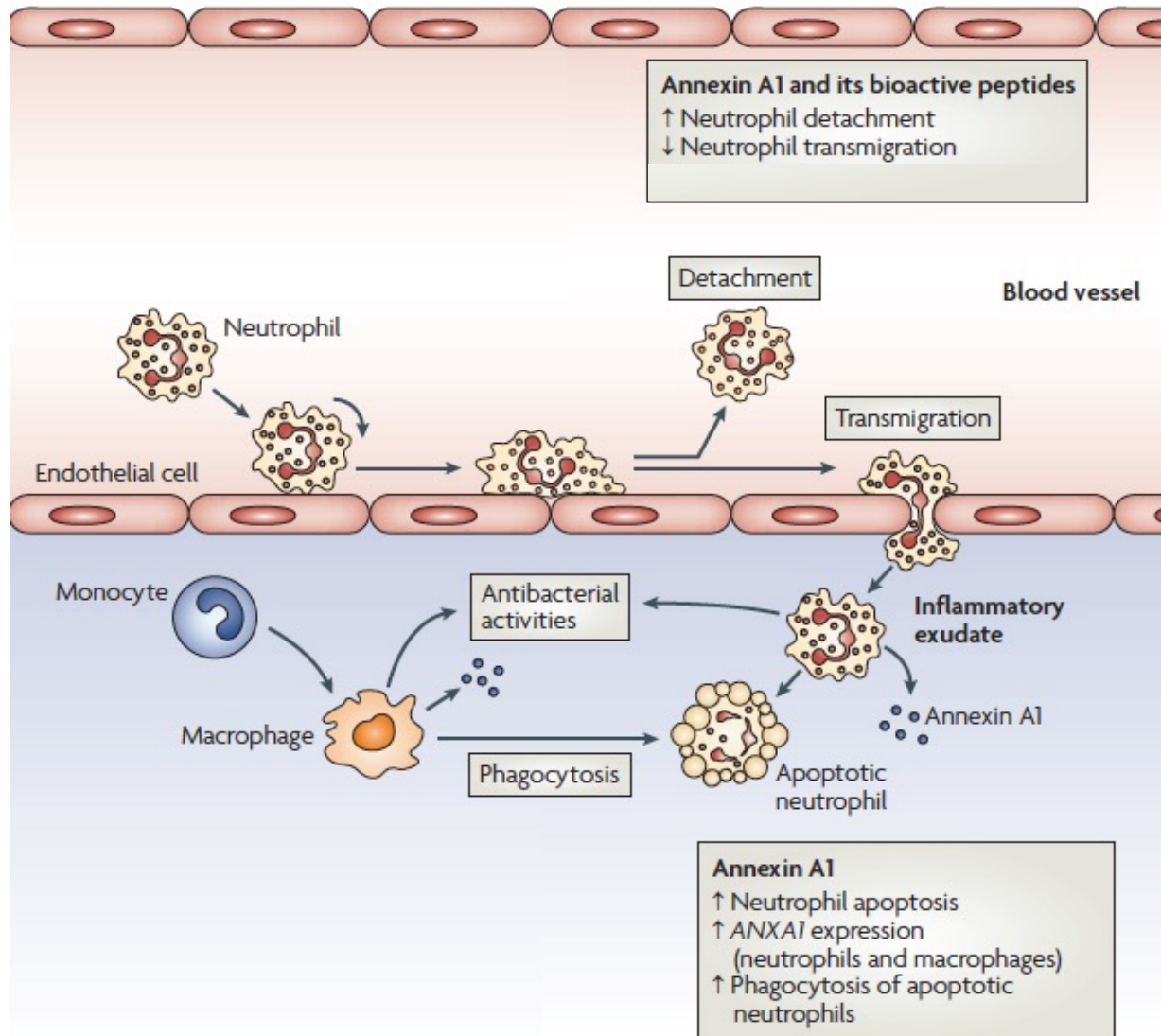




Nei neutrofili l'annexin A1 è presente nei granuli terziari. In seguito ad attivazione dei leucociti come nel caso del contatto con le cellule degli endoteli annexin A1 viene rilasciata dai granuli:

- limitando il reclutamento dei leucociti dal circolo
- limitando la produzione di mediatori pro-infiammatori
- inducendo l'apoptosi dei neutrofili
- modulando il reclutamento dei monociti
- Aumentando l'eliminazione dei neutrofili da parte dei macrofagi

Meccanismi di azione dell'Annexin A1



Il legame dell'annexina A1 favorisce il distacco dei neutrofili all'endotelio

Aumenta la fagocitosi dei neutrofili da parte dei macrofagi

L'apoptosi dei neutrofili è centrale nella risoluzione dell'inflammatione

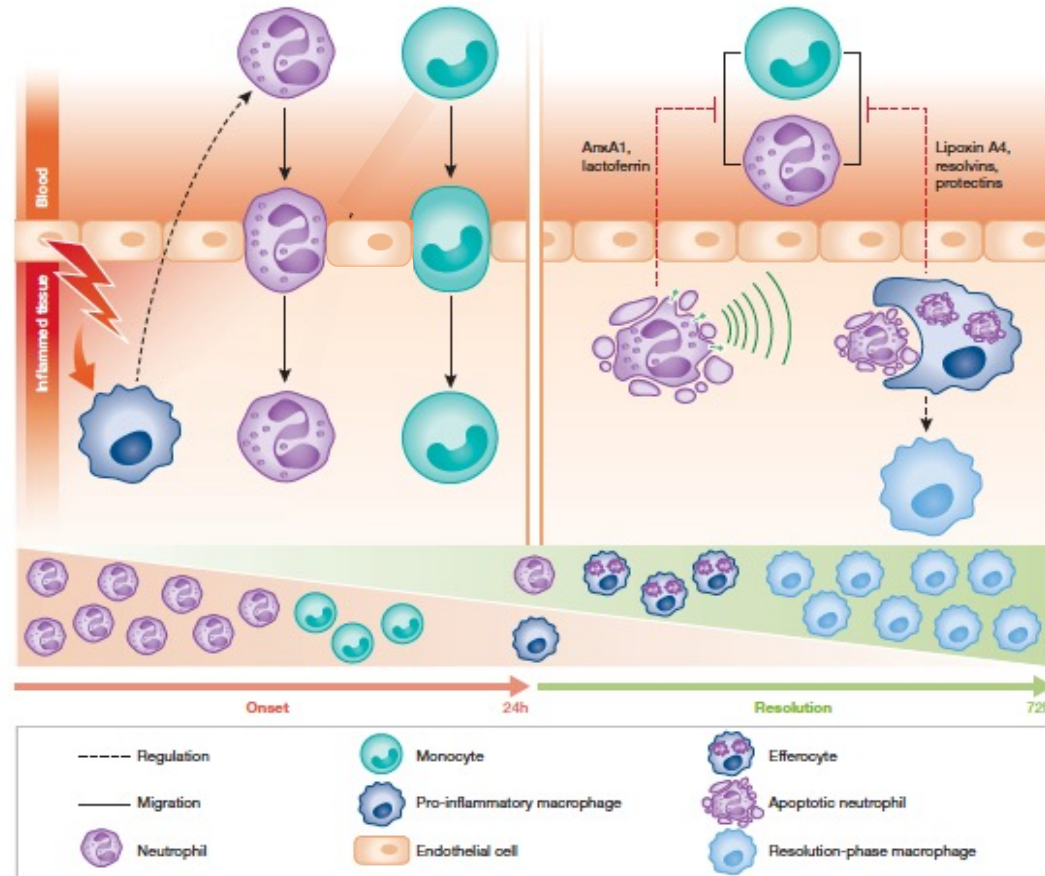
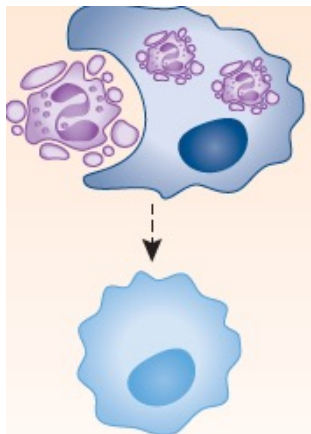
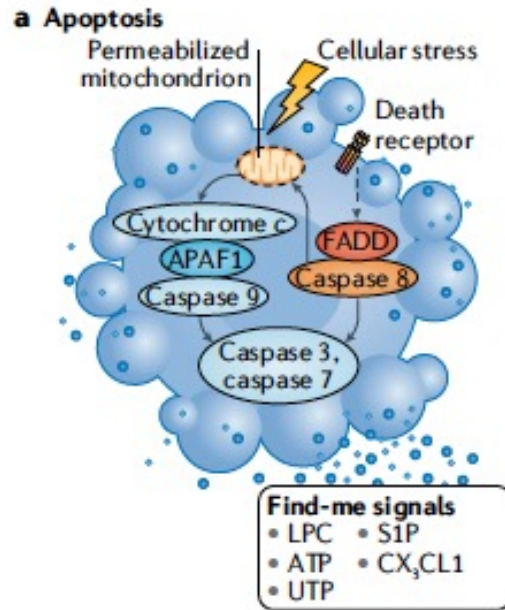


Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation. Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of a apoptotic neutrophils changes the macrophage phenotype towards a resolution-phase macrophage, which promotes return to tissue homeostasis. A switch in tissue (stromal) cells can also contribute to generate the initial signals for resolution to start.

L'efferocitosi dei neutrofili spegne l'infiammazione



I neutrofili apoptotici sono eliminati dai macrofagi mediante l'efferocitosi (engulfment and clearance of dead and dying cells). In seguito alla efferocitosi dei neutrofili i macrofagi arrestano la produzione di citochine pro-infiammatorie e dei mediatori lipidici e attivano un programma trascrizionale anti-infiammatorio caratterizzato dal rilascio di IL-10 e TGF- β .

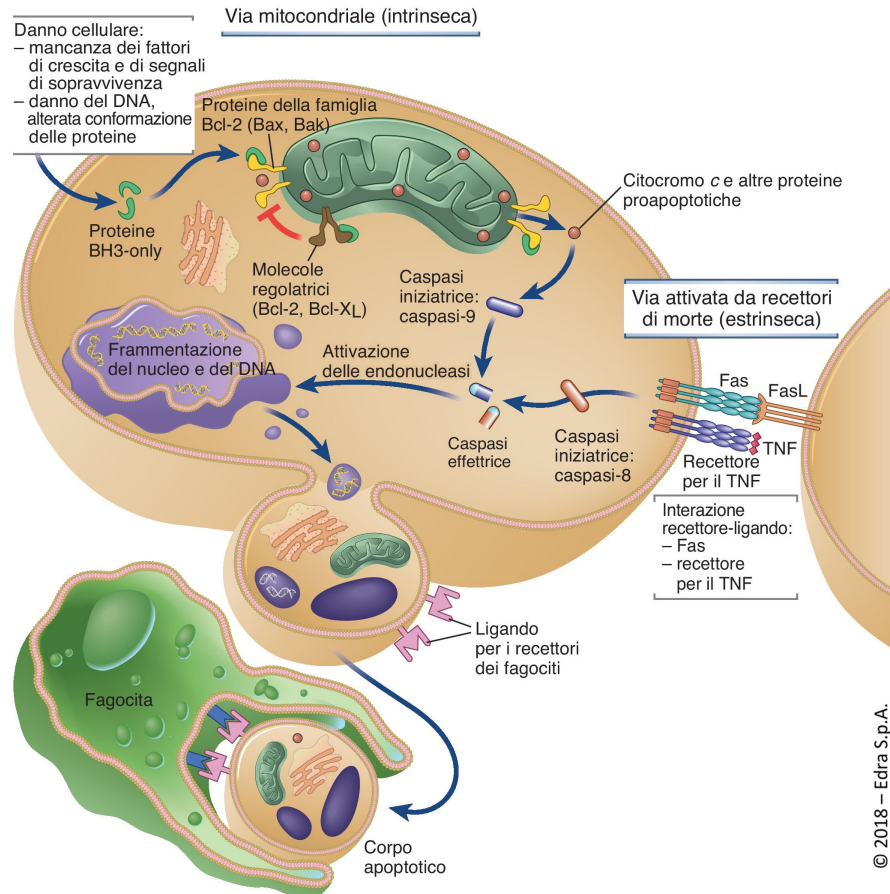
Durante l'apoptosi la cellula morente va incontro a:

- riduzione del volume cellulare
- condensazione della cromatina. Il nucleo può andare incontro a frammentazione all'interno della cellula.
- rottura della cellula in piccole vescicole chiuse chiamate corpi apoptotici composti da citoplasma e organelli con o senza frammenti nucleari. Durante l'intero processo, il contenuto cellulare non fuoriesce nell'ambiente extracellulare, in quanto si conserva l'integrità della membrana plasmatica.

Apoptosi

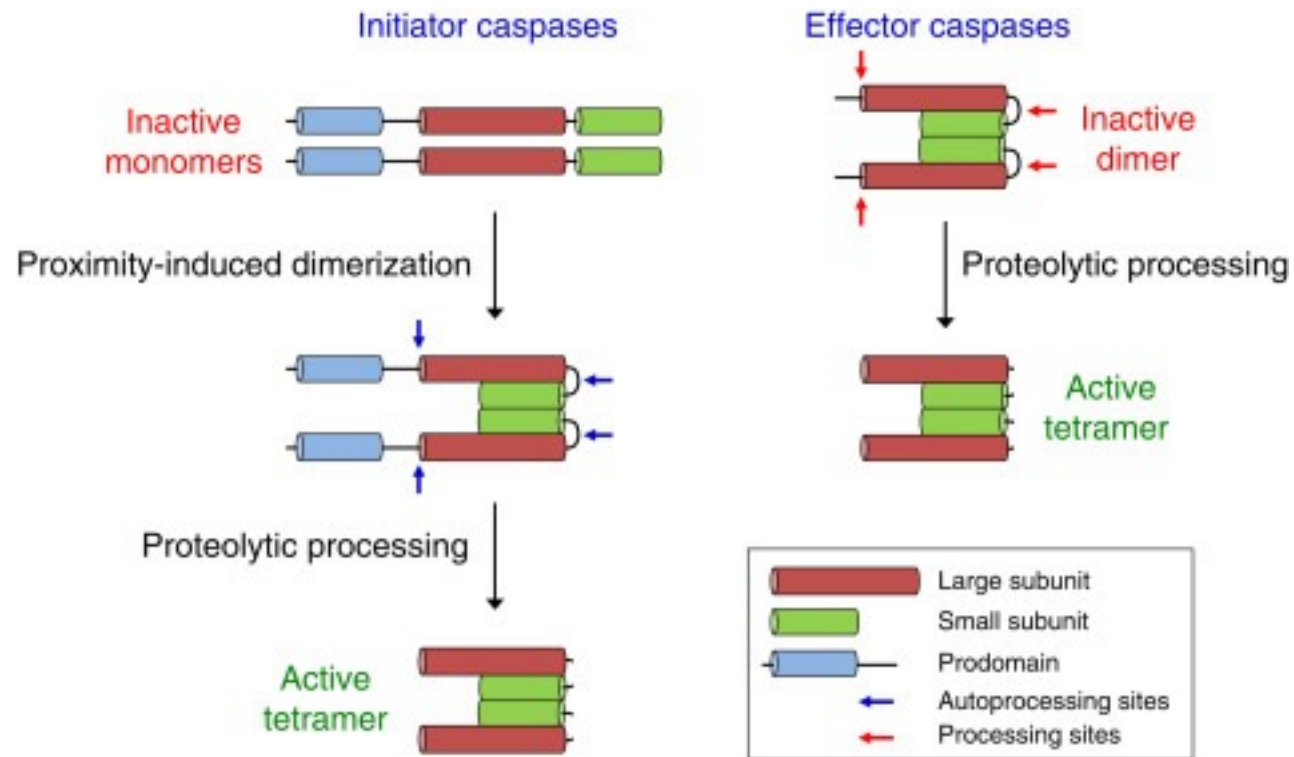
L'innescò dell'apoptosi può avvenire per via intrinseca o estrinseca.

La via estrinseca è innescata da recettori di morte che attivano la caspasi 8 (cistein aspartato proteasi) scatenando una attivazione a cascata di altre caspasi. L'attivazione delle caspasi effettrici determina il taglio di diverse proteine del citoscheletro, come ad esempio dell'inibitore della DNasi citoplasmatica con conseguente taglio internucleosomico del DNA.



La via intrinseca dipende dall'aumento della permeabilità mitocondriale e dal rilascio di molecole proapoptotiche nel citoplasma. La via intrinseca dell'apoptosi è regolata dalle proteine appartenenti alla famiglia BCL-2. Alcuni membri di questa famiglia sono pro-apoptotici e altri anti-apoptotici. Sotto stimoli apoptotici i membri proapoptotici della famiglia BCL-2 aumentano la permeabilità della membrana mitocondriale favorendo la fuoriuscita nel citoplasma di del citocromo c. Il citocromo c lega APAF-1 che dopo polimerizzazione attiva la Caspasi 9 che a sua volta attiva le caspasi effettrici (caspasi -3,-6,-7).

Apoptosi



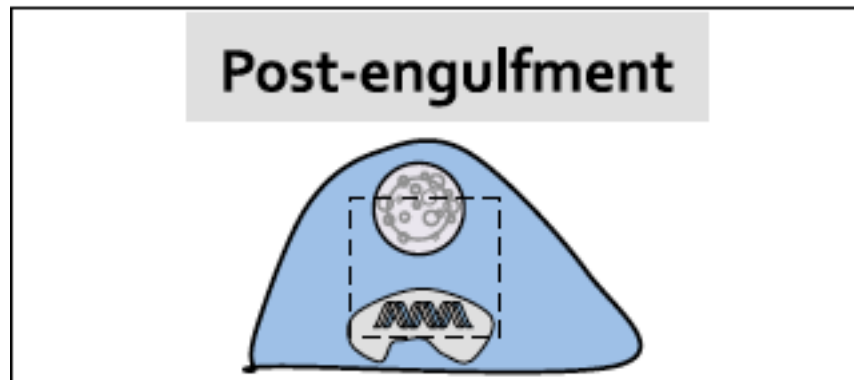
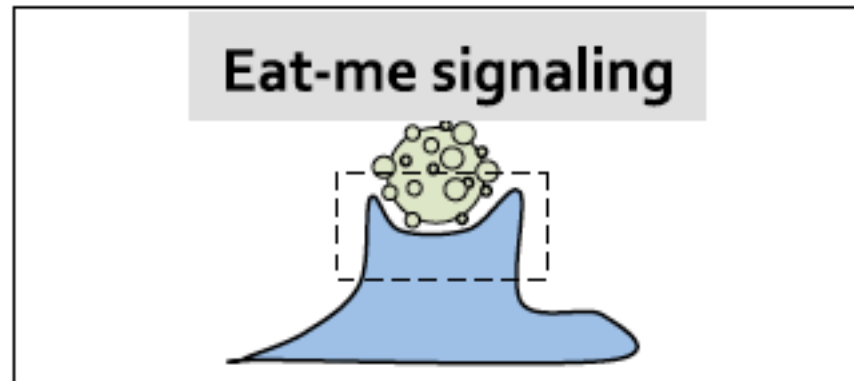
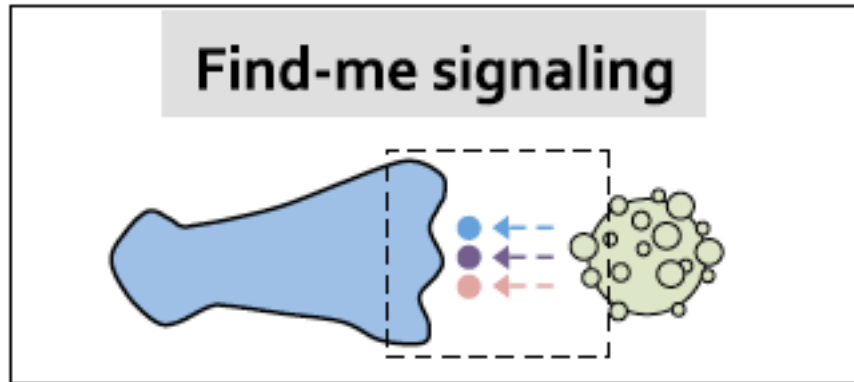
L'apoptosi è determinata dalla attivazione delle caspasi che sono proteasi contenenti cisteina nel loro sito attivo.

Le caspasi esistono come proenzimi inattivi che devono essere scissi per essere attivati.

Il processo di apoptosi può essere distinto in una fase di inizio e una di esecuzione. Nella fase di inizio sono attivate le caspasi iniziatrici che agiscono sulle caspasi a valle. Nella fase di esecuzione sono attivate le caspasi effettrici che agiscono su proteine cellulari nucleari e citoplasmatiche responsabili della morte della cellula.

Le caspasi iniziatrici includono la caspasi 8 e la 9; le caspasi effettrici la 3, 6, 7.

Riconoscimento dei neutrofili in apoptosi



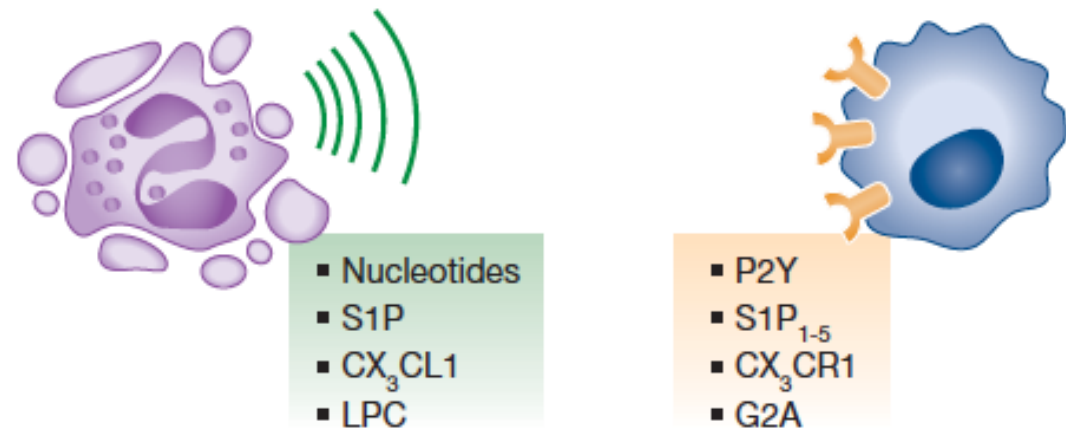
Durante l'apoptosi le cellule rilasciano segnali solubili nell'ambiente extracellulare che attirano i macrofagi e ne stimolano le capacità fagocitiche.

Questi segnali definiti «find me signals» includono:

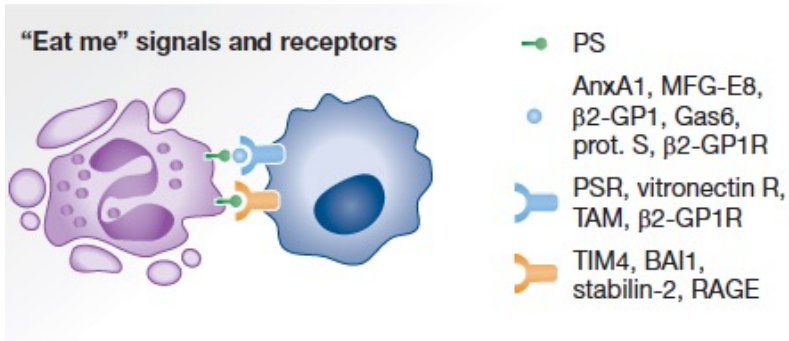
- Lipidi di membrana modificati lisofosfatidil colina (LPC) e sfingosina-1-fosfato (S1P), ATP e chemochine

Durante l'apoptosi la caspasi 3 scinde attivandola la PLA₂ che genera lisofosfatidil colina dalla fosfatidil colina. LPC è secreta dalla cellula mediante trasportatori.

“Find me” signals and receptors



Segnali di riconoscimento dei neutrofili in apoptosi

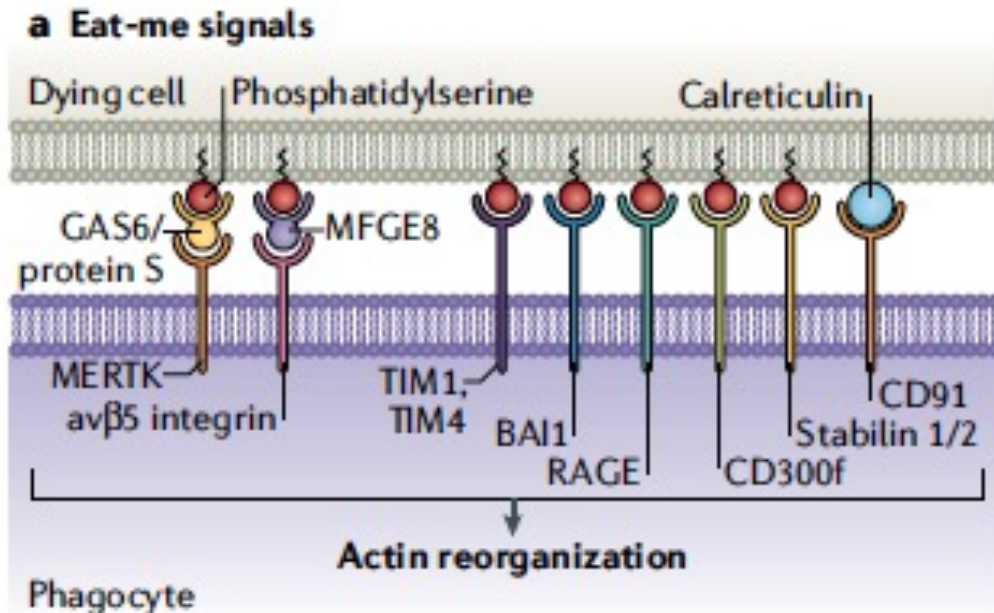


Le cellule morenti presentano sulla loro superficie segnali «eat me» che permettono ai macrofagi di discriminare le cellule in apoptosi da quelle sane.

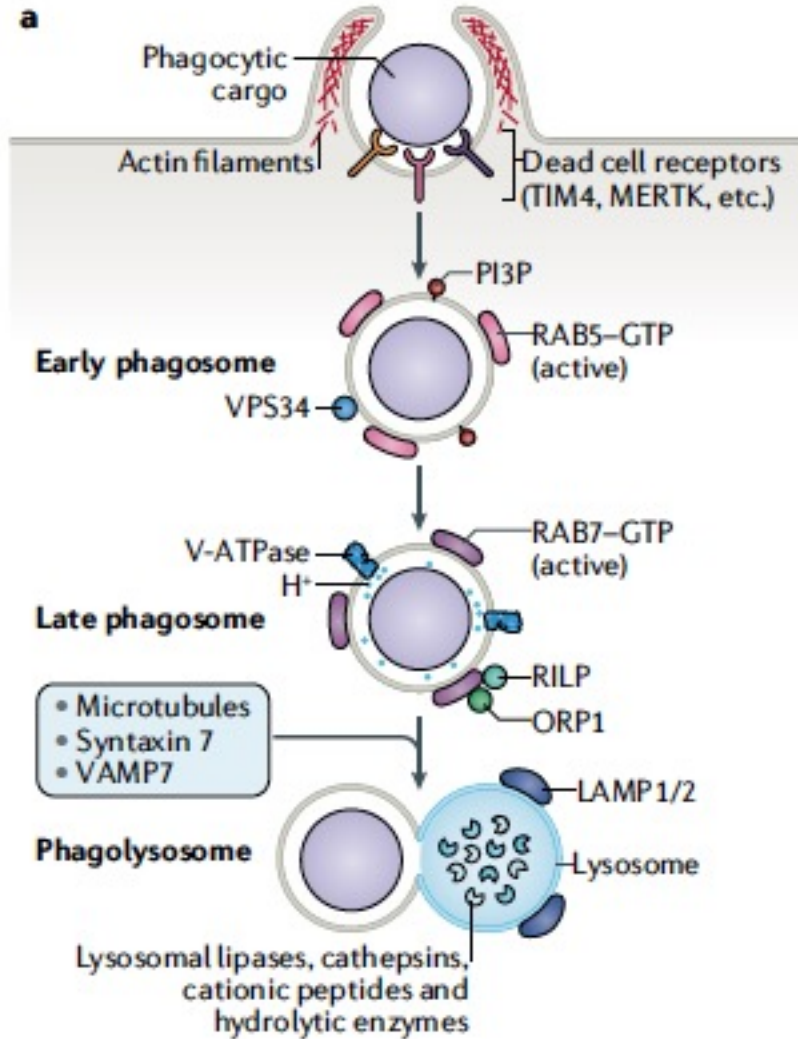
Le cellule morenti perdono l'asimmetria dei fosfolipidi di membrana (fosfatidil etanolamina e fosfatidil serina nello strato interno della membrana plasmatica) che è mediata dalla flippase ATP11 che confina la fosfatidilserina (PS) nello strato interno della membrana plasmatica e ne limita la mobilità laterale nelle cellule sane.

Durante l'apoptosi l'inattivazione di ATP11 da parte della caspasi 3 promuove l'esposizione della fosfatidil serina sulla superficie delle cellule apoptotiche rendendole riconoscibili da parte dei macrofagi.

I recettori della fosfatidilserina includono T cell immunoglobulin mucin receptor (TIM4) o fattori solubili che fanno da ponte fra le integrine e recettori TAM e la PS (bridged by milk fat globule-EGF factor 8, MFGE8)

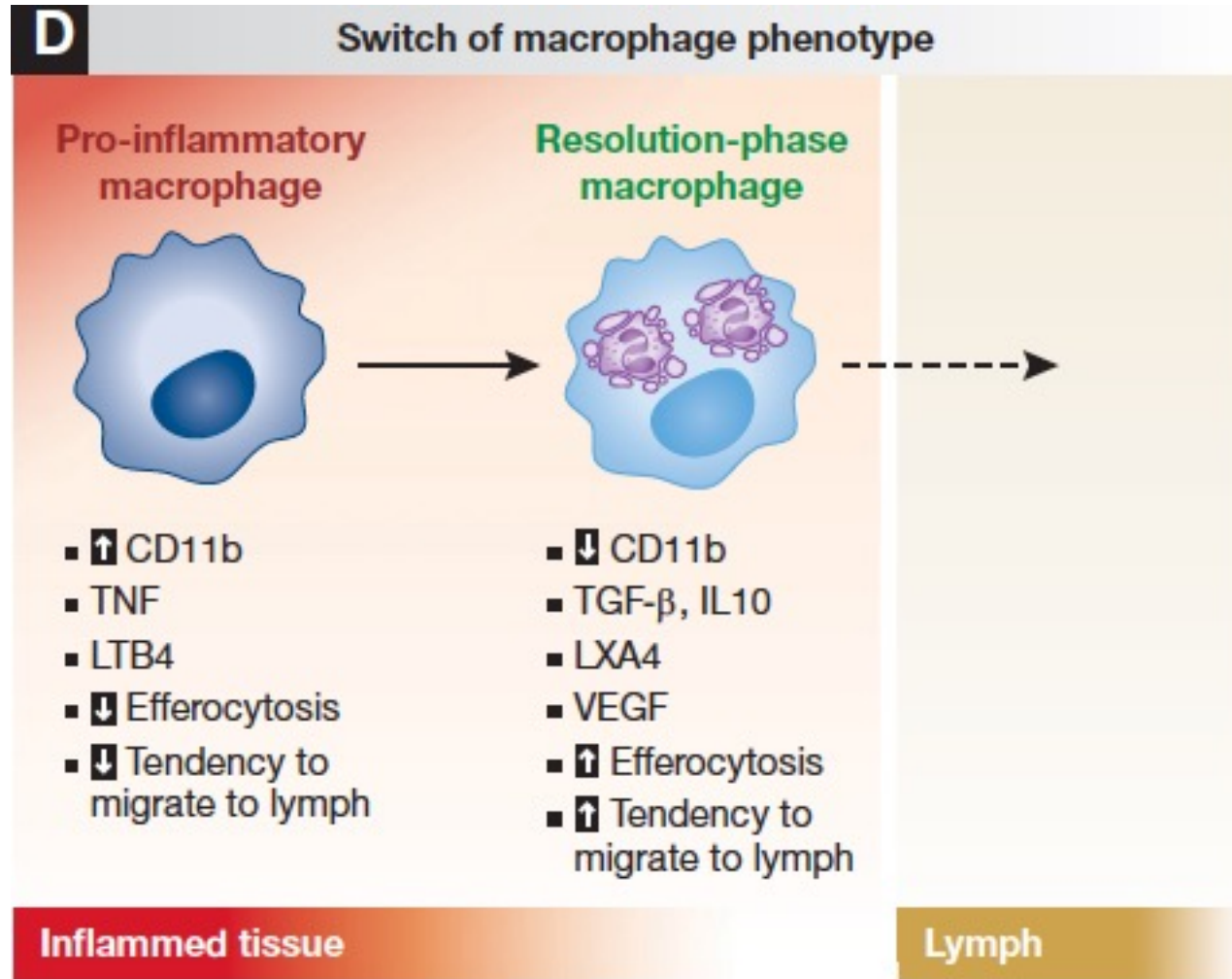


Degradazione



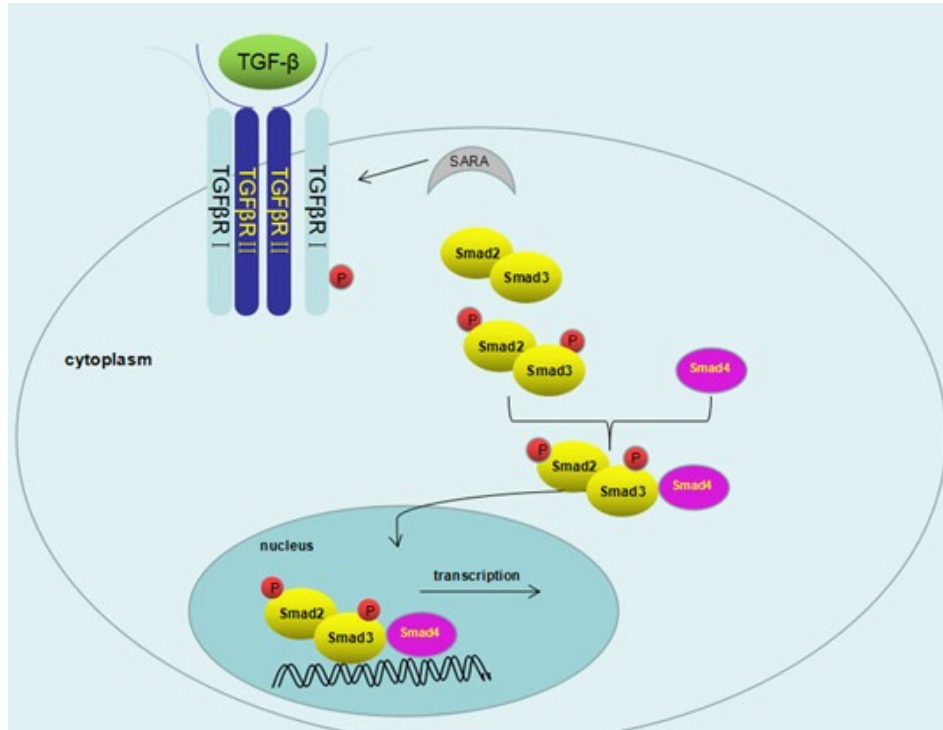
L'eliminazione dei corpi apoptotici da parte del fagocita avviene nel lisosoma e prevede la maturazione del fagosoma

Cambiamento funzionale dei macrofagi durante la risoluzione dell'inflammatione



Durante l'efferocitosi dei neutrofili apoptotici i macrofagi rilasciano molecole ad attività anti-inflammatoria che includono le citochine TGF- β e IL-10 e mediatori lipidici quali la lipoxina A4 (LXA4). I macrofagi della fase di risoluzione mostrano una più elevata capacità di fagocitare i neutrofili apoptotici, una ridotta risposta alla stimolazione del TLR4 (ligando dell'LPS).

Azione del TGF- β e IL-10



L'IL-10 inibisce l'attività dei macrofagi

I TGF- β (Fattore di crescita trasformante) sono una famiglia di citochine strettamente correlate denominate TGF- β 1, - β 2, - β 3. Il TGF- β 1 è sintetizzato come precursore inattivo che deve essere scisso per formare un omodimero. Il recettore del TGF- β 1 (serin treonin chinasi) è costituito da due catene coinvolte nella fosforilazione dei fattori di trascrizione della famiglia SMAD.

Il TGF- β 1

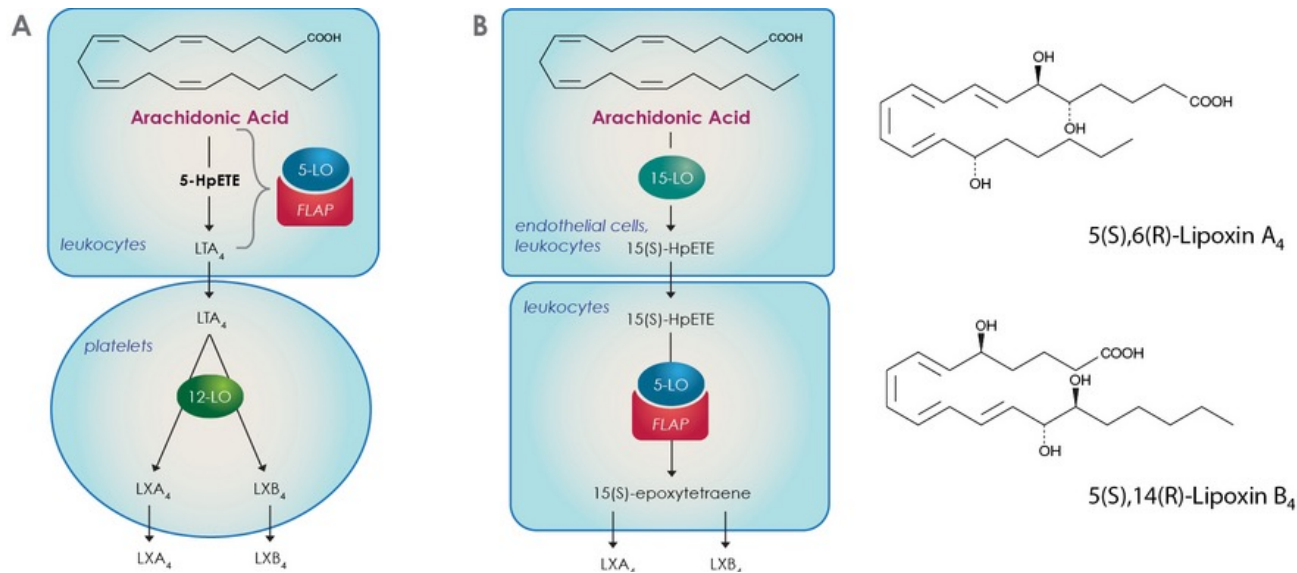
- inibisce l'attivazione in senso classico dei macrofagi
- Inibisce l'attivazione dei neutrofili e delle cellule endoteliali
- Promuove la riparazione dei tessuti stimolando la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti e stimolando nei fibroblasti e nei macrofagi la sintesi di collagene

Mediatori lipidici promuoventi la risoluzione dell'inflammatione

La risoluzione dell'infezione si accompagna alla sintesi di mediatori lipidici ad attività anti-inflammatoria.

Le lipossine sono derivati dell'acido arachidonico e possono essere prodotte attraverso 2 vie.

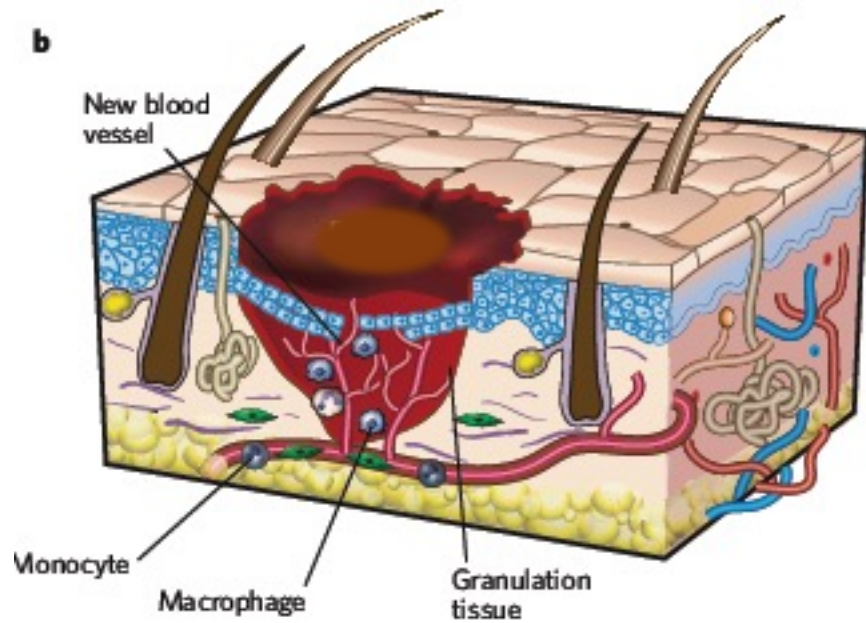
- L'acido arachidonico è convertito in 15(S)-HpETE (acido idroperossieicosatetraenoico) da parte della 15-lipossigenasi
- In seguito alla secrezione 15(S)-HpETE viene captato e convertito dalla 5-LO in lipossina.



Le lipossine:

- Bloccano la migrazione dei neutrofili nei tessuti
- Bloccano la produzione di TNF- α da parte dei leucociti
- Promuovono la efferocitosi dei macrofagi

Riparazione



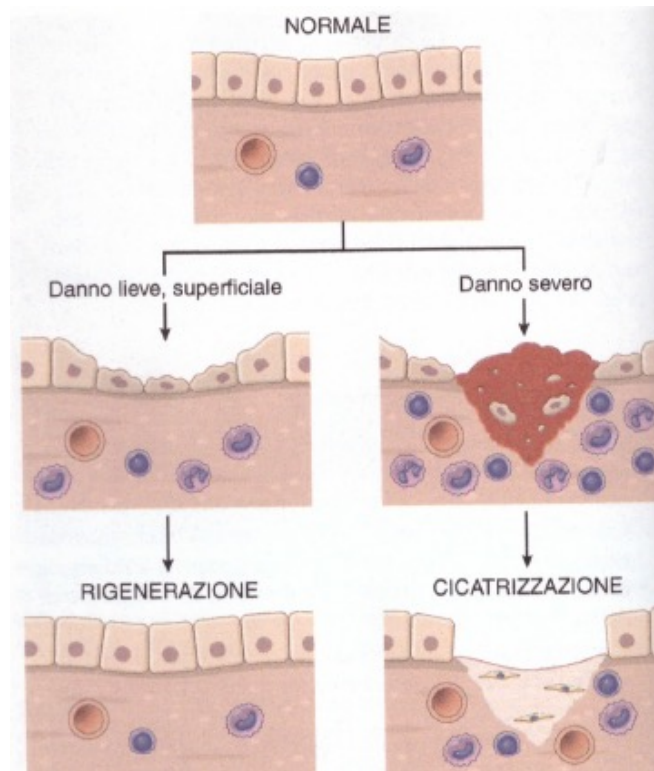
La risposta infiammatoria agli agenti lesivi serve non solo per eliminarli ma anche per avviare la riparazione tissutale.

Il processo infiammatorio inizia il processo di guarigione e di ripristino della normale struttura e funzione del tessuto danneggiato.

Riparazione tissutale

La riparazione dei tessuti danneggiati avviene con due processi:

- **Rigenerazione:** ripristino delle cellule normali. Può avvenire attraverso la proliferazione di cellule differenziate o delle cellule staminali di un tessuto.
- **Formazione della cicatrice:** deposizione di tessuto connettivo con formazione di una cicatrice. Questo avviene nel caso in cui un tessuto non sia in grado di rigenerarsi o se le strutture di supporto del tessuto sono state danneggiate. Anche se la cicatrice non è in grado di svolgere le funzioni delle cellule parenchimali perse, garantisce la stabilità strutturale e la funzione del tessuto.



In molti tipi di danno sia la rigenerazione che la cicatrizzazione contribuiscono alla riparazione finale. Entrambi i processi coinvolgono la proliferazione di diverse cellule e l'interazione fra le cellule e la matrice extracellulare.

Capacità proliferative dei tessuti

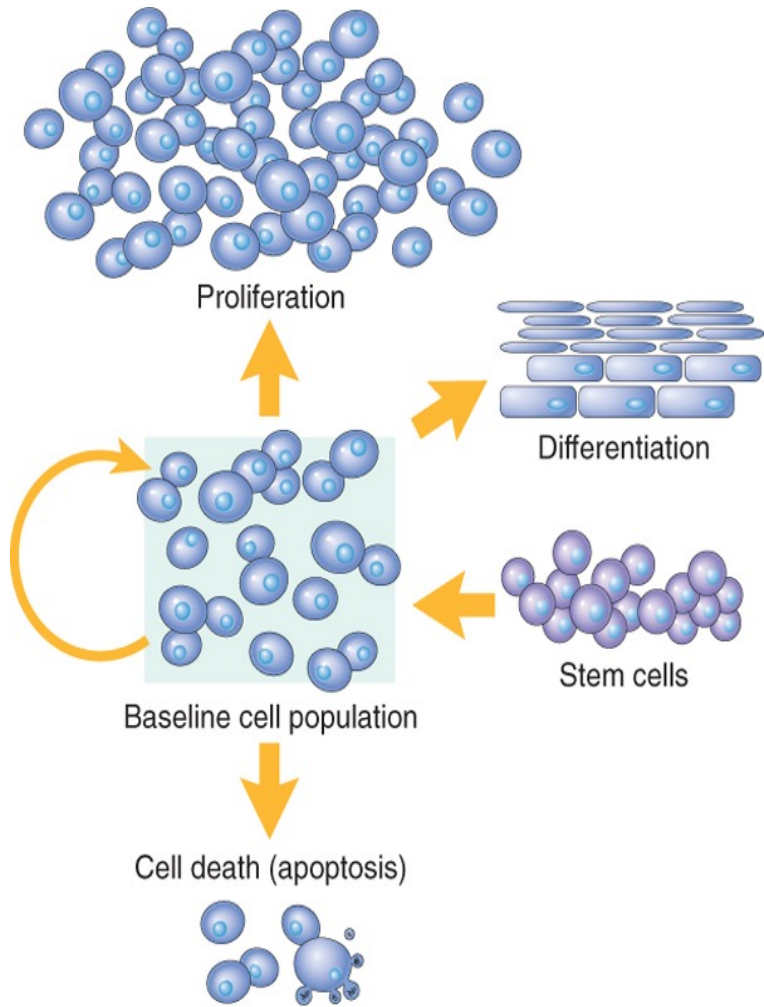
La capacità dei tessuti di riparare è influenzata dalla capacità proliferativa intrinseca, i tessuti possono essere distinti in:

Tessuti labili: (continuamente in replicazione), e cellule di questi tessuti sono continuamente perse e rimpiazzate tramite la differenziazione di cellule staminali. Alcuni esempi includono le cellule ematopoietiche, la maggior parte degli epitelii di superficie: della pelle; dei dotti escretori delle ghiandole esocrine (pancreas, ghiandole salivari..); del tratto intestinale, dell'utero.

Tessuti stabili: le cellule di questi tessuti sono quiescenti e hanno una minima attività replicativa in condizioni normali. In risposta al danno o alla perdita di massa tissutale le cellule del tessuto hanno la capacità di proliferare. Le cellule stabili si trovano nel fegato, nel rene e sono cellule stabili anche le cellule endoteliali, i fibroblasti.

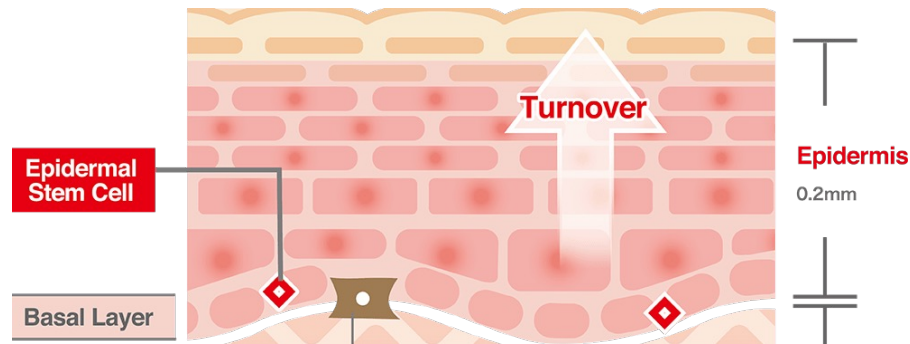
Tessuti perenni: le cellule di questi tessuti sono considerate incapaci di proliferare. La maggior parte dei neuroni e delle cellule del muscolo cardiaco appartengono a questa categoria. Fatta eccezione per i tessuti composti da cellule perenni, la maggior parte dei tessuti maturi contiene percentuali variabili di cellule in continua replicazione, cellule quiescenti che possono riprendere il ciclo cellulare e cellule che hanno perso la capacità replicativa.

Meccanismi che regolano le popolazioni cellulari



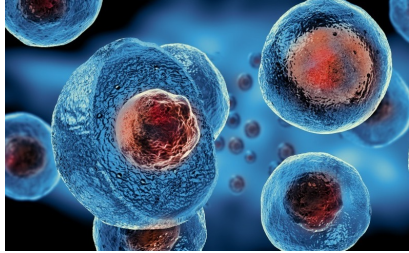
© Elsevier. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8e - www.studentconsult.com

Nei tessuti che si rigenerano le cellule mature sono cellule differenziate terminali. Quando le cellule mature muoiono sono rimpiazzate dalla differenziazione di nuove cellule che derivano dalle cellule staminali. La normale dimensione numerica delle popolazioni cellulari è determinata dall'equilibrio tra proliferazione cellulare, differenziamento, morte cellulare e generazione di nuove cellule a partire dalle cellule staminali.



La relazione dinamica fra le cellule staminali e le cellule differenziate è evidente nell'epitelio cutaneo in cui le cellule staminali nello strato basale dell'epitelio si dividono e le cellule figlie differenziano e migrano verso gli strati superiori fino a morire e esfoliare.

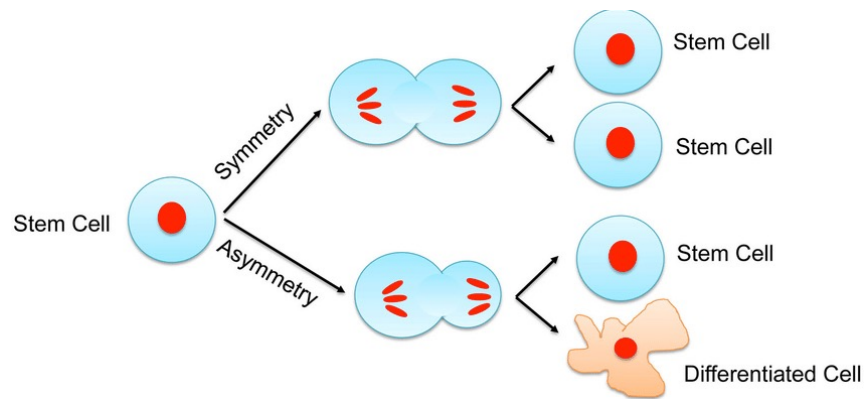
Le cellule staminali



Le cellule staminali sono caratterizzate da:

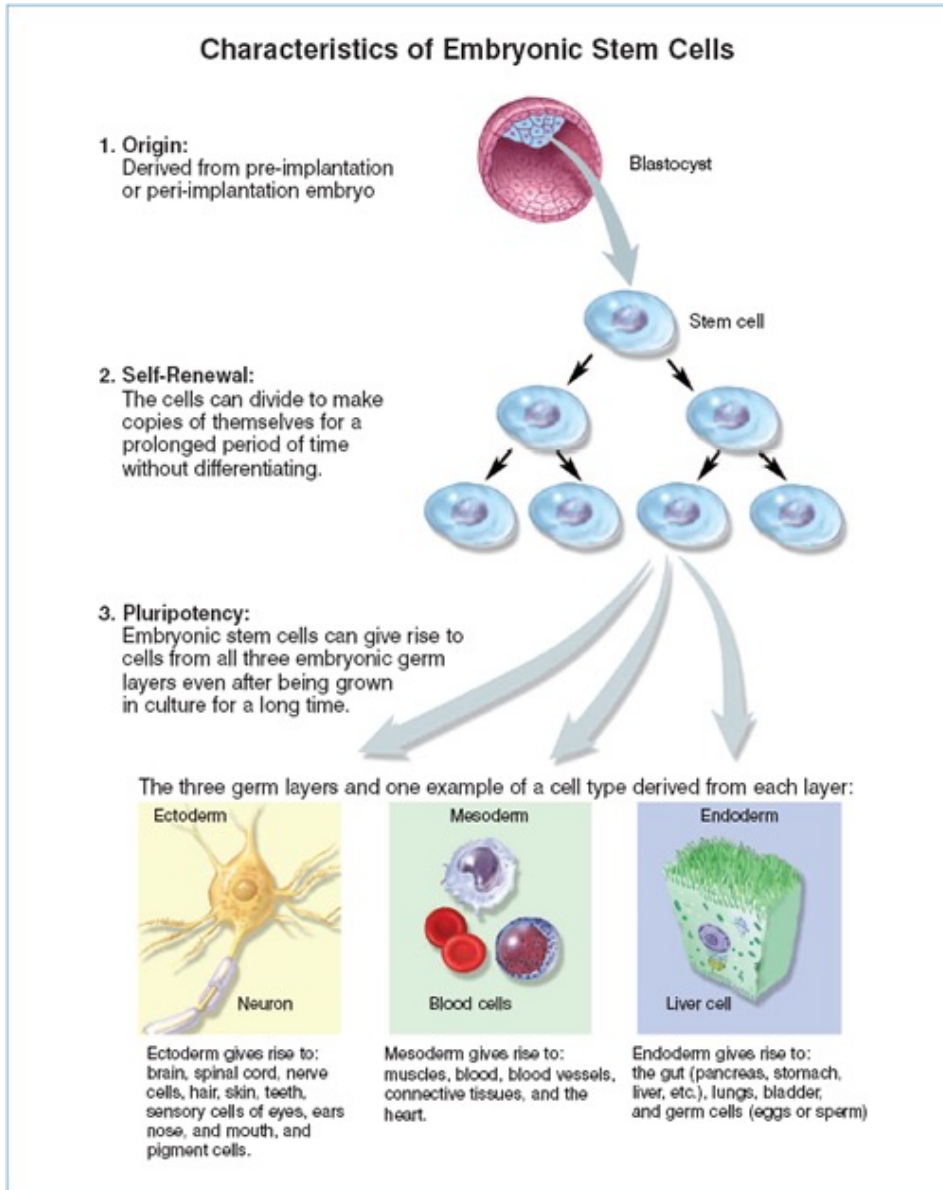
- i) capacità di autorinnovarsi
- ii) replicazione asimmetrica

L'autorinnovamento permette alle cellule staminali di mantenere una popolazione di precursori che si autorinnovano.



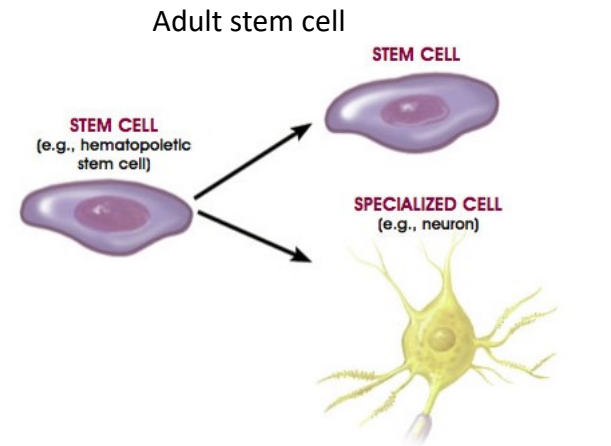
Stem cells undergo either symmetric or asymmetric division. When a stem cell undergoes a symmetric division, it produces two daughter cells that are identical to their mother. In asymmetric division, a stem cell divides to generate one daughter cell that is identical to the mother cell and another daughter cell with more restricted potential. It is generally believed that most, if not all, of stem cells that reside in the body undergo asymmetric division to maintain tissue homeostasis.

Cellule staminali embrionali e adulte

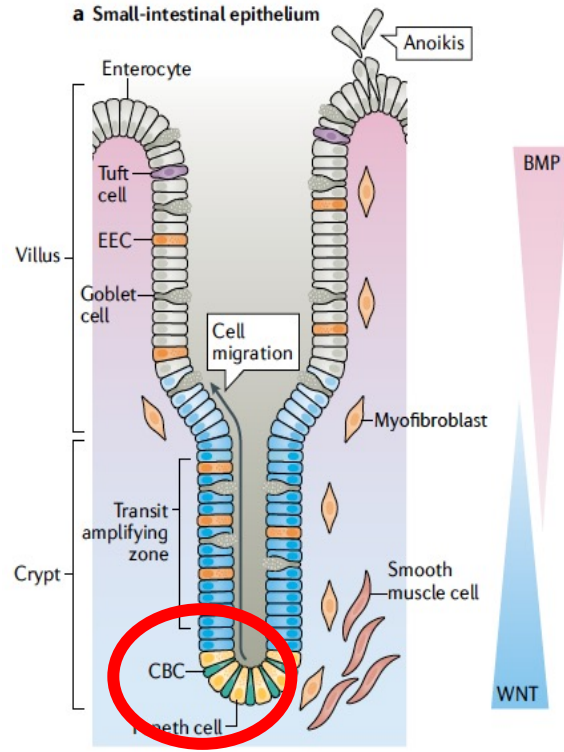
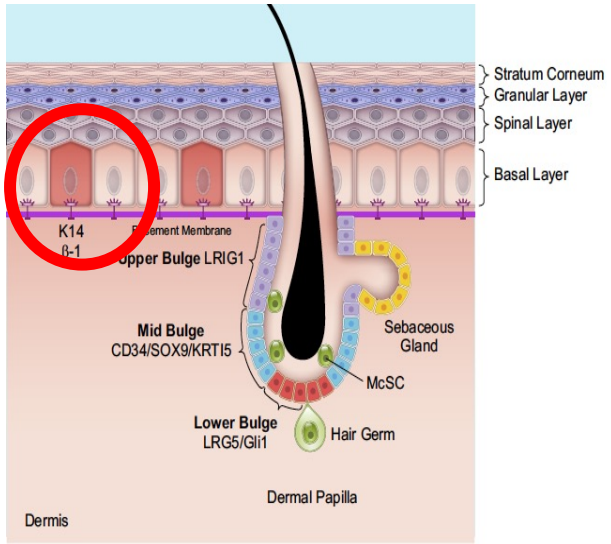


Le cellule staminali embrionali (ES) sono presenti all'interno della blastocisti e hanno una grande capacità di autorinnovamento. In appropriate condizioni di coltura possono dare origine a cellule che derivano da tutti e tre i foglietti embrionali. Le ES danno origine alle cellule di tutto il corpo.

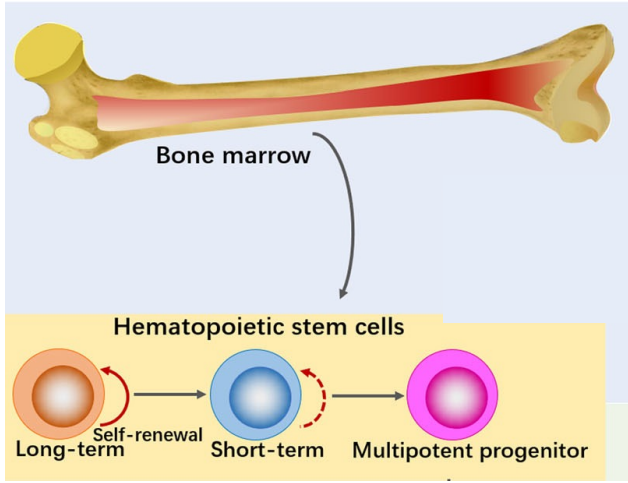
Le cellule staminali adulte si trovano fra le cellule differenziate all'interno di un tessuto e hanno un potenziale di differenziazione più ristretto.



Cellule staminali adulte



CBC=crypt based columnar



Le cellule staminali adulte sono coinvolte nella omeostasi dei tessuti.

Queste mantengono le dimensioni dei tessuti ad alto ricambio come ad esempio la pelle l'intestino e il sangue. In condizioni normali garantiscono il ricambio cellulare (turn-over) dei tessuti.

Si localizzano nelle nicchie delle cellule staminali e segnali provenienti da altre cellule le mantengono quiescenti.

Le cellule staminali più studiate e maggiormente utilizzate in clinica sono le cellule staminali ematopoietiche (HSC). Queste cellule danno origine a tutte le componenti del sangue. Possono essere isolate dal midollo osseo o dopo mobilizzazione dal sangue periferico con il trattamento con il GM-CSF.

Nel midollo osseo sono presenti anche le cellule staminali mesenchimali che possono dare origine a condroblasti, osteoblasti e mioblasti.

Le cellule staminali adulte possono generare un repertorio limitato di cellule differenziate.