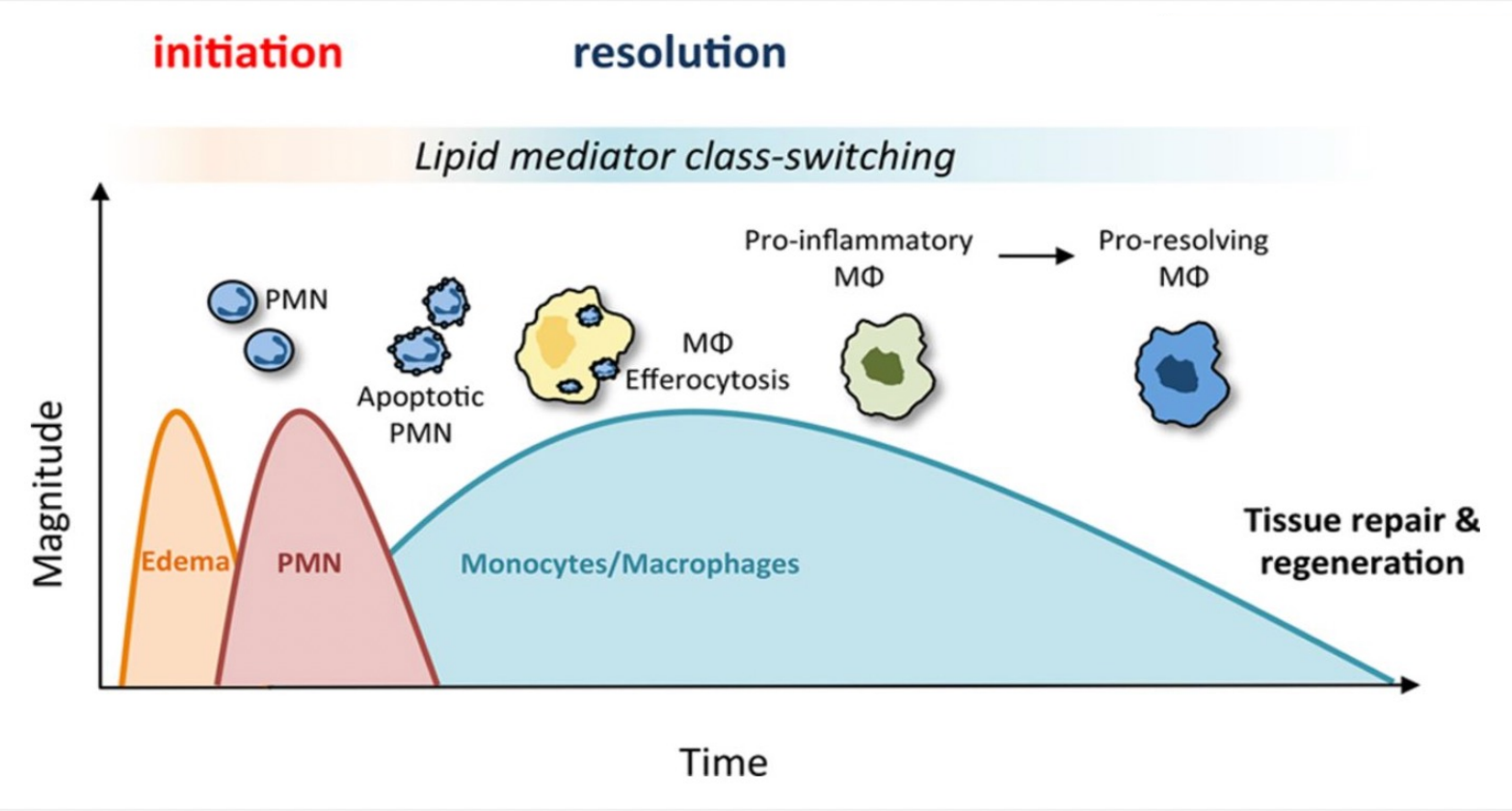
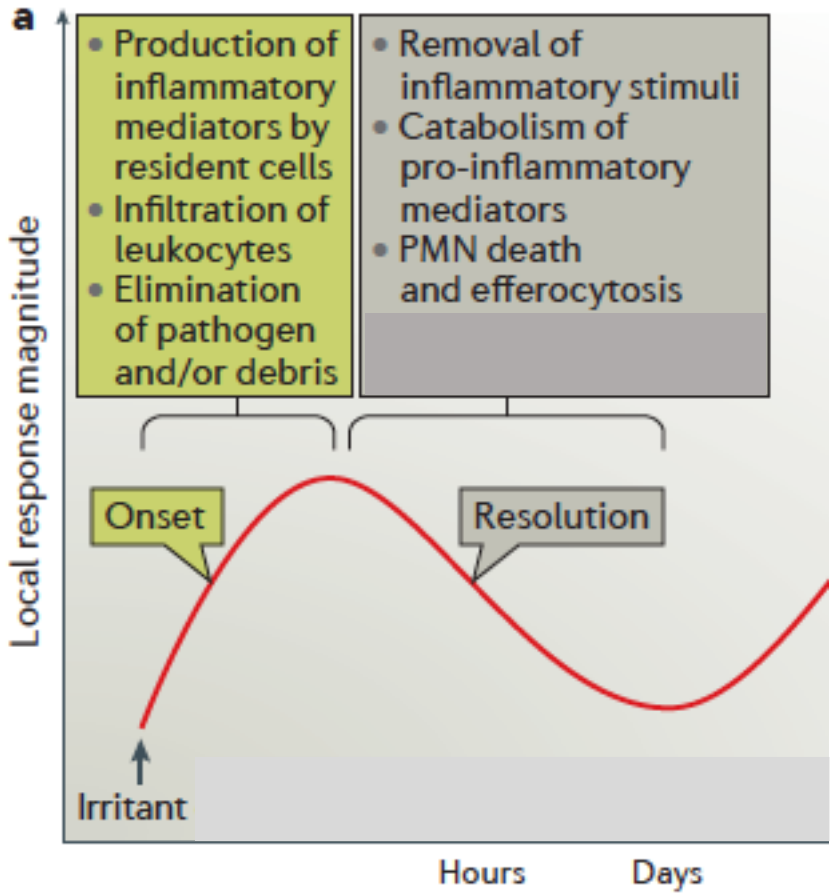
Risoluzione dell'infiammazione



La risposta infiammatoria acuta può essere divisa in due fasi: l'inizio e la risoluzione. La risoluzione dell'infiammazione ha inizio quando i neutrofili che sono stati richiamati nel tessuto dallo stimolo flogistico diventano apoptotici.

I neutrofili apoptotici sono rimossi dai macrofagi che derivano dal differenziamento dei monociti richiamati dal circolo sanguigno nel tessuto.

Risoluzione dell'infiammazione



Il periodo fra il picco dell'influsso delle cellule infiammatorie nel sito leso 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

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

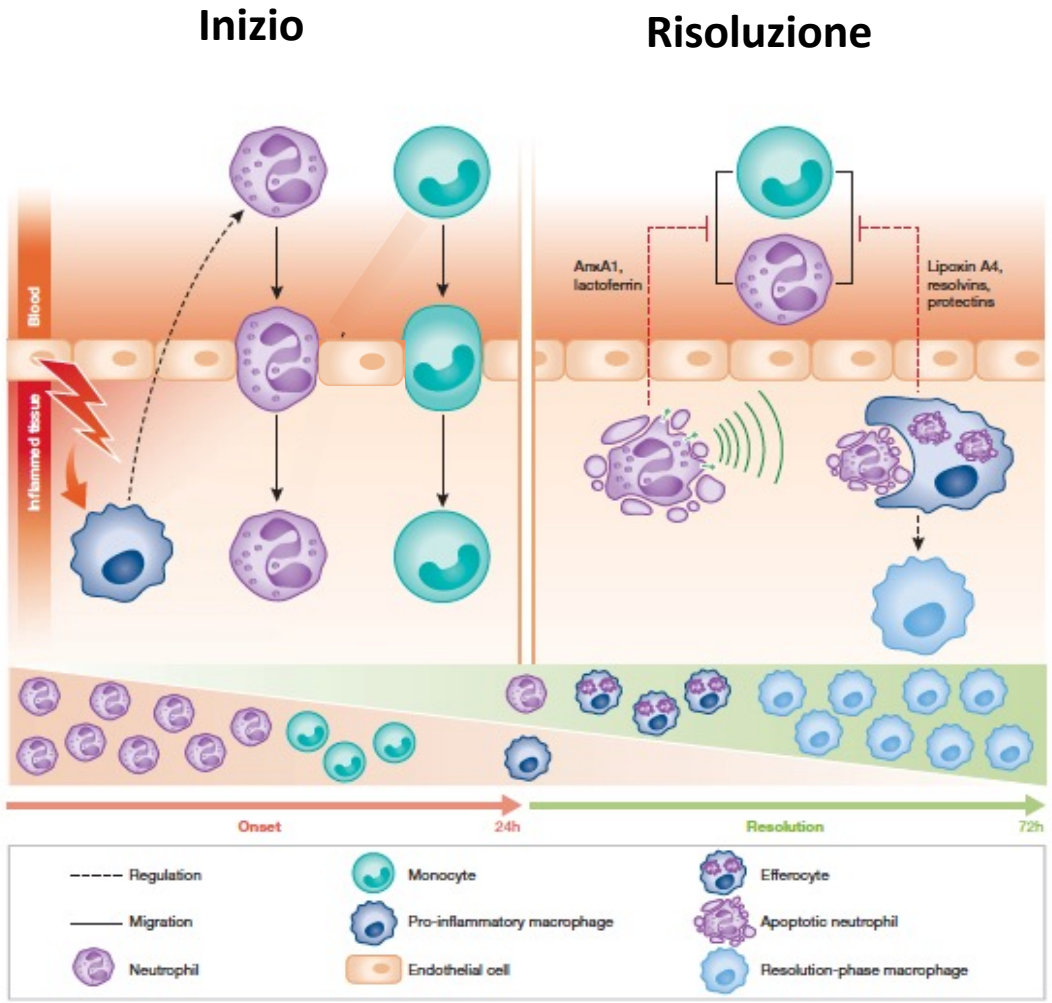
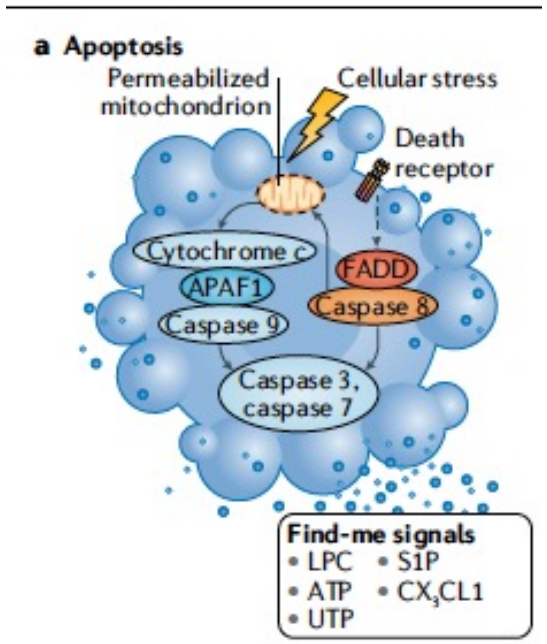


Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation. Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of 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. La captazione dei neutrofili apoptotici da parte dei macrofagi, (efferocitosi; engulfment and clearance of dead and dying cells) è un processo anti-infiammatorio che si associa ad una ridotta produzione di citochine pro-infiammatorie e dei mediatori lipidici e all’attivazione di un programma trascrizionale anti-infiammatorio caratterizzato dal rilascio di IL-10 e TGF-β da parte dei macrofagi.

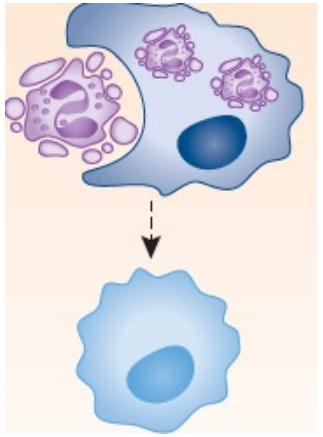
La rimozione tempestiva dei patogeni e dei corpi apoptotici è necessaria per evitare danni nei tessuti circostanti e per dare inizio al riparo del tessuto.

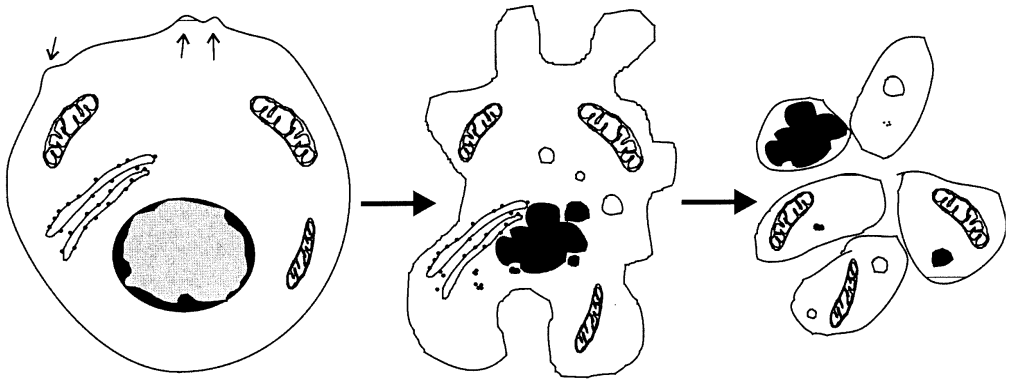
L’apoptosi dei neutrofili



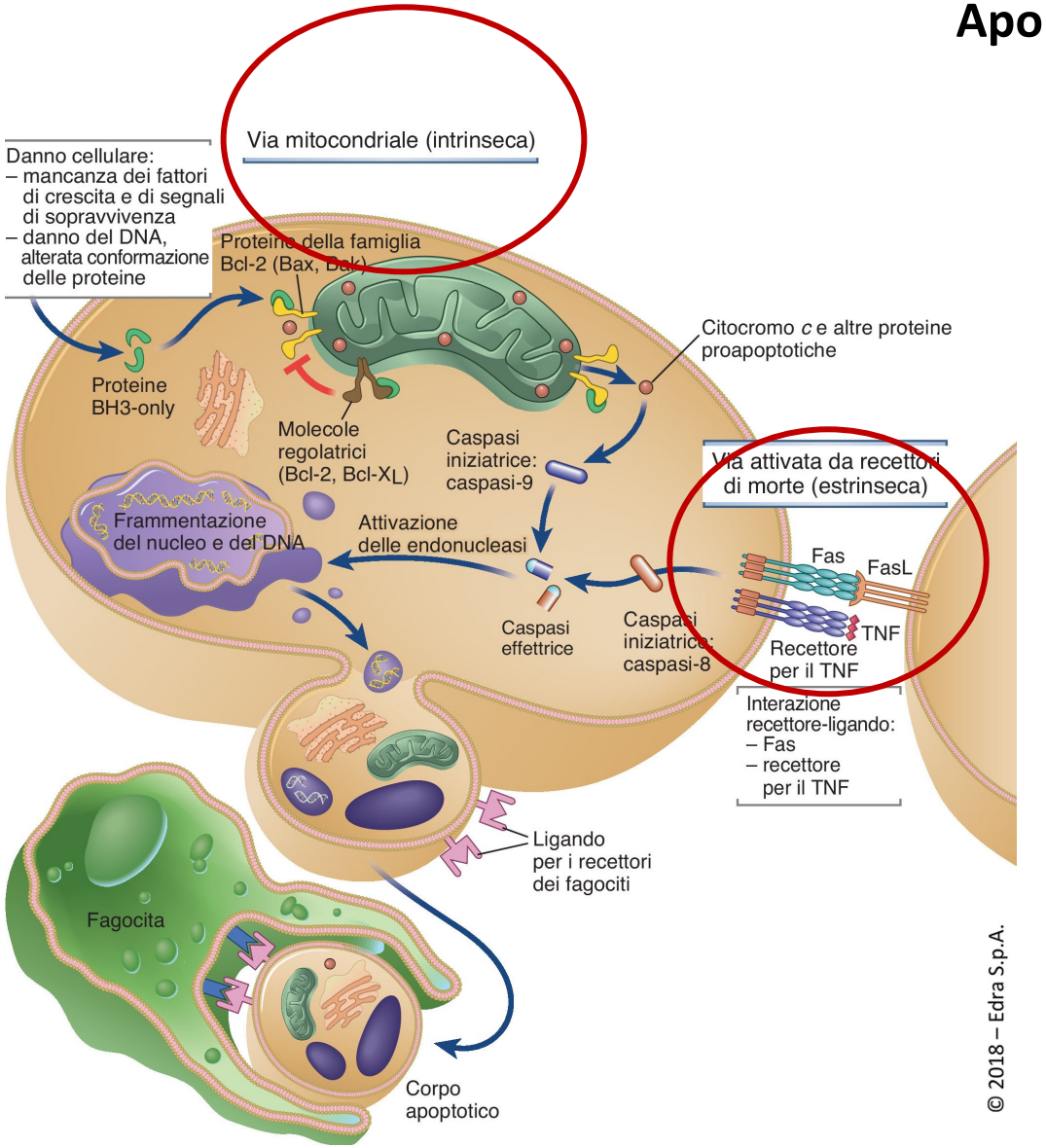
Durante l'apoptosi la cellula morente va incontro a:

- riduzione del volume cellulare; formazione di protuberanze della membrana plasmatica
- Compattamento della cromatina, frammentazione del DNA. 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

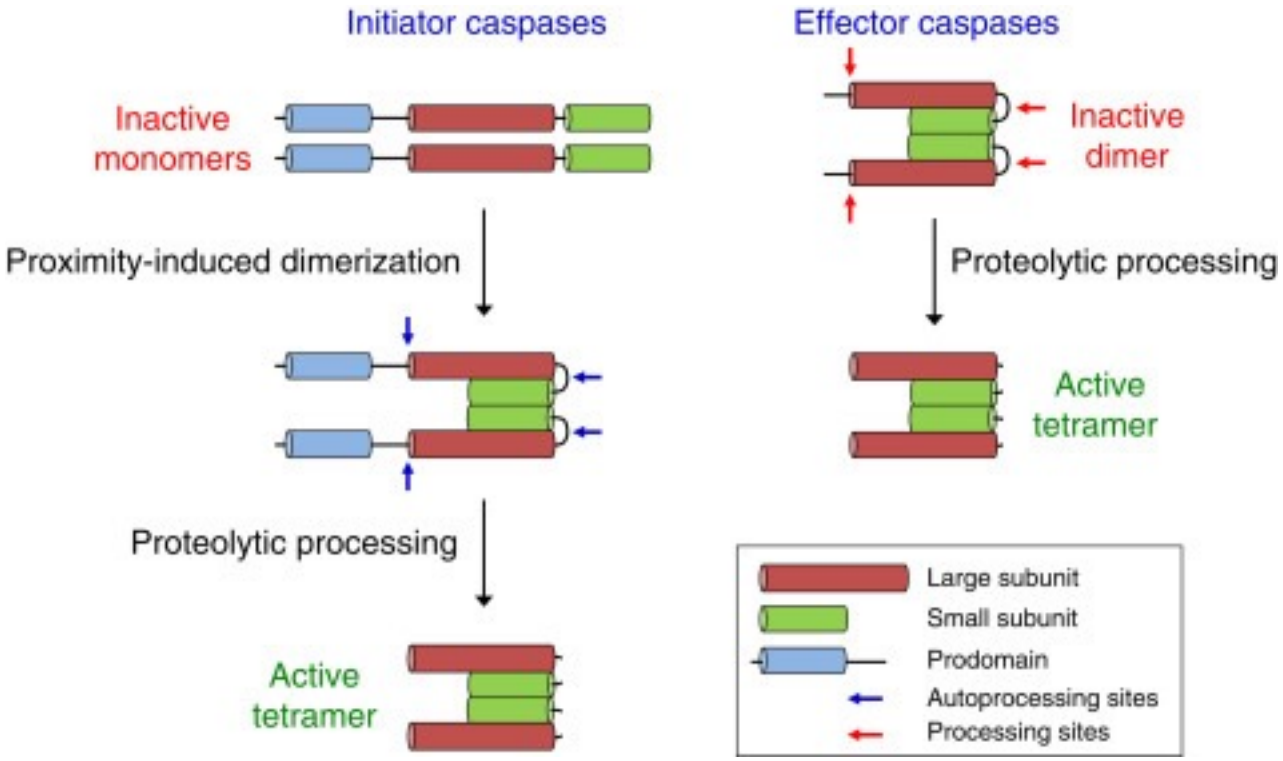


L'innesco dell'apoptosi può avvenire per **via estrinseca o intrinseca**.

La via estrinseca è innescata da recettori di morte espressi 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 fra cui quelle del citoscheletro o 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 proapototici della famiglia BCL-2 aumentano la permeabilità della membrana mitocondriale favorendo la fuoriuscita nel citoplasma 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



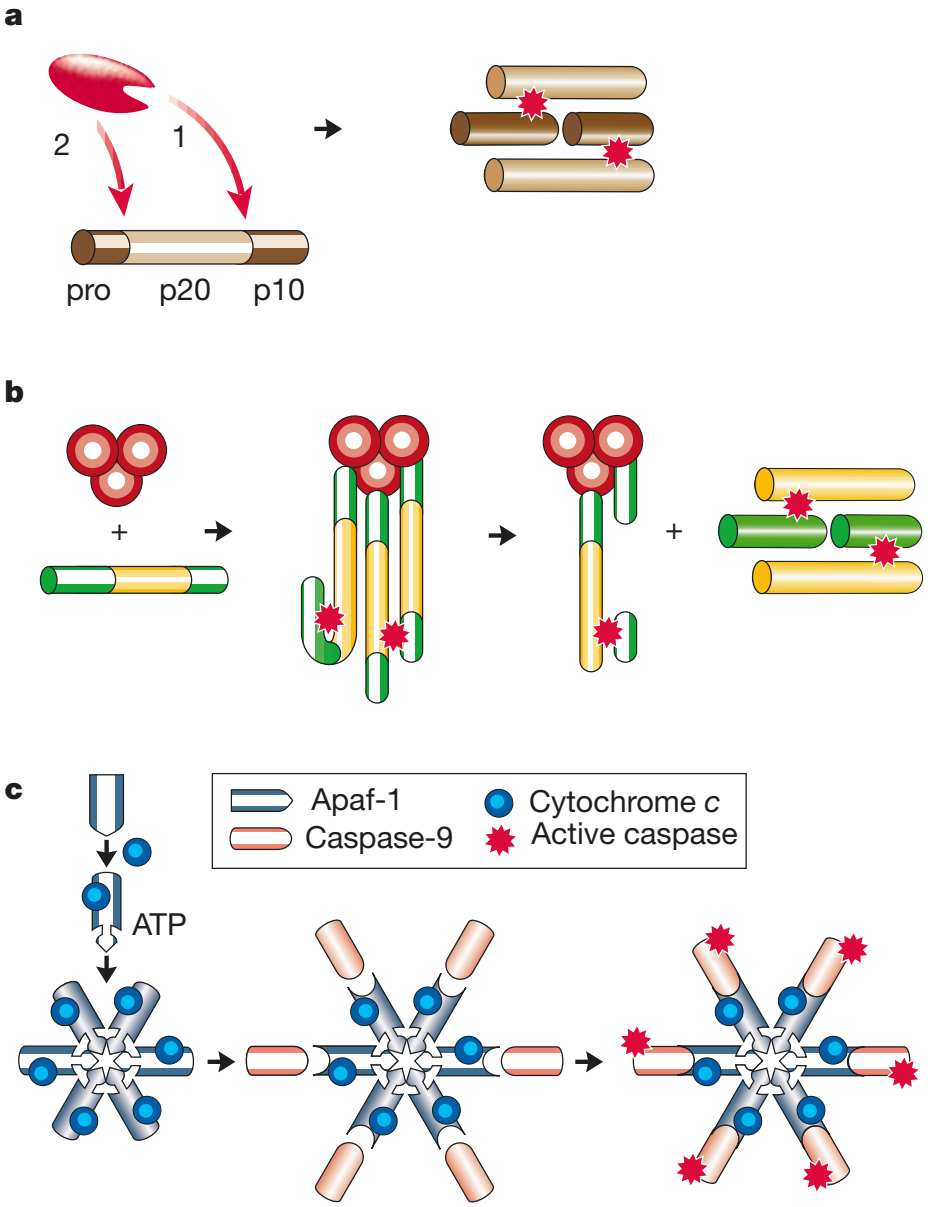
L'apoptosi è determinata dalla attivazione delle caspasi che sono proteasi contenenti cisteina nel loro sito attivo.

Le caspasi esistono come proenzimi inattivi che devono esse 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.

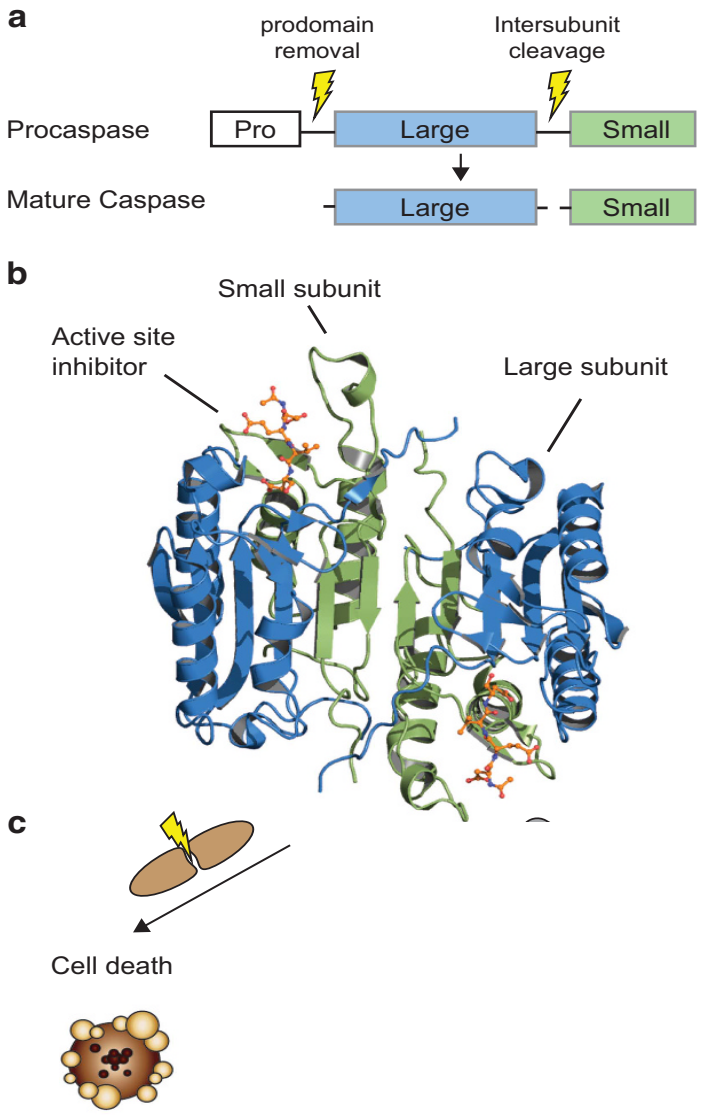
Le caspasi iniziatrici includono la caspasi 8 e la 9; le caspasi effettrici la 3, 6,7.

Attivazione delle caspasi



L'attivazione delle caspasi può avvenire attraverso la scissione proteolitica: i) da parte di una caspasi a monte; ii) per prossimità della caspasi (reclutamento e aggregazione della stessa pro-caspase ; iii) formazione di un oloenzima (formazione del complesso APAF-1 citocromo C caspasi-9).

Struttura delle caspasi

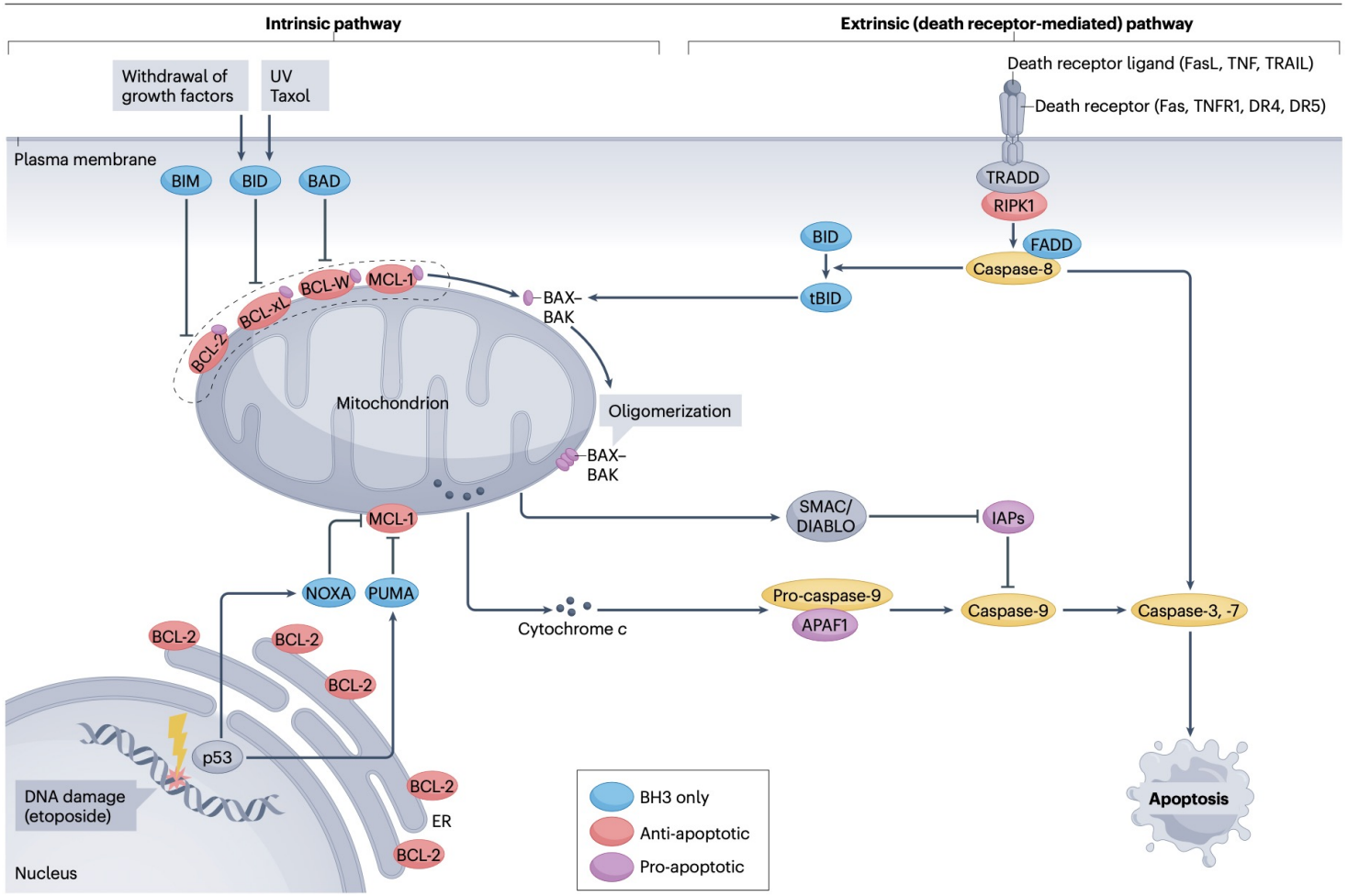


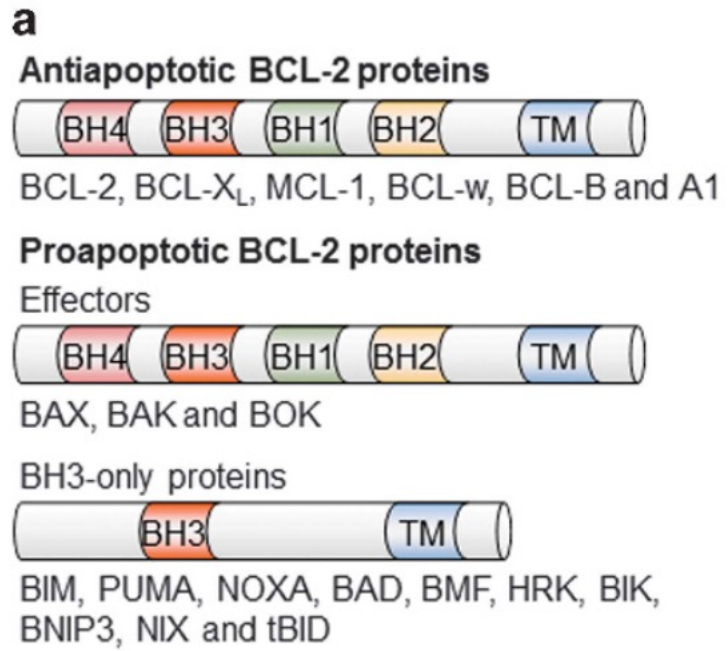
Le caspasi mature sono formate da un dimero di due molecole orientate testa coda ciascuna costituita da una subunità large e una subunità small contenenti un sito attivo.

Le pro-caspasi 8 e 9 sono dei monomeri e sono attivate in seguito a reclutamento su proteine adattatrici e/o taglio nella regione linker fra la subunità large e la subunità small.

Le pro-caspasi effettrici (3, 6, 7) sono dimeri e sono attivate in seguito al taglio della regione linker fra la subunità large e small da parte delle caspasi iniziatrici.

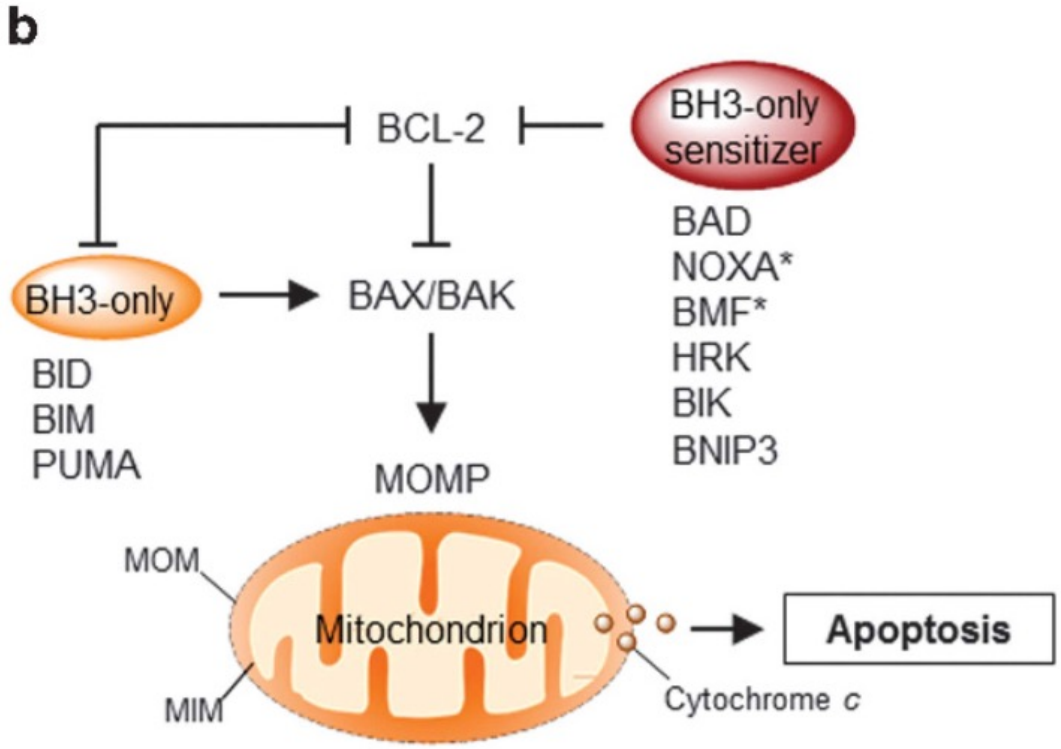
La via intrinseca dell'apoptosi è regolata dalle molecole appartenenti alla famiglia BCL-2





Le proteine BCL-2 regolano la via intrinseca dell'apoptosi in cui lo step critico è rappresentato dalla permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale. Queste molecole sono distinte in molecole pro-apoptotiche e anti-apoptotiche. Le pro-apoptotiche includono: BAX, BAK e BOK e le molecole BH3-only. Le molecole anti-apoptotiche includono BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-w.

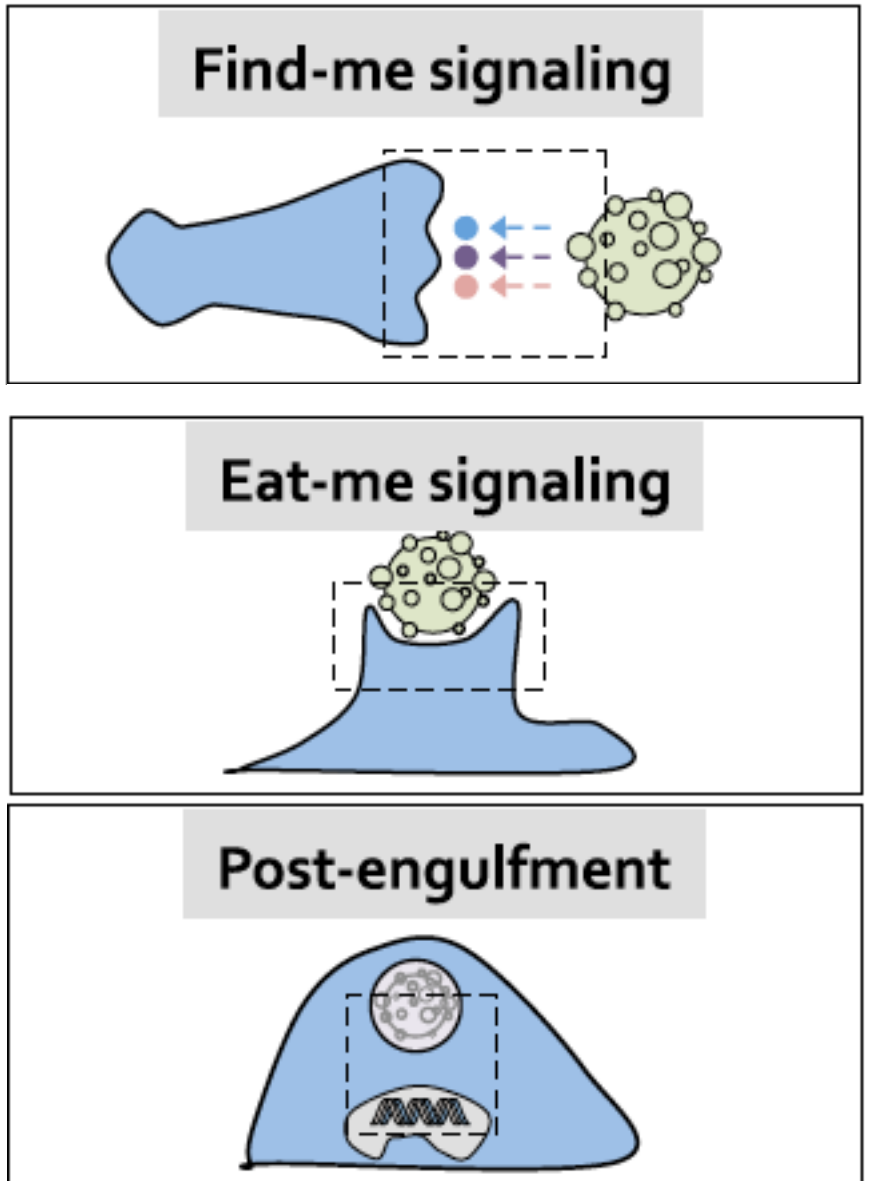
Apoptosi intrinseca



In seguito all'attivazione da parte di stimoli apoptotici BAX, BAK e BOK inducono la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna attraverso la formazione di pori promuovedo il rilascio di citocromo C.

Le molecole pro-apoptotiche BH3-only possono attivare BAX e BAK attraverso una interazione diretta (BID, BIM, PUMA) o agire indirettamente attraverso l'interazione con le molecole anti-apoptotiche e bloccando la loro azione inibitoria su BAX, BAK.

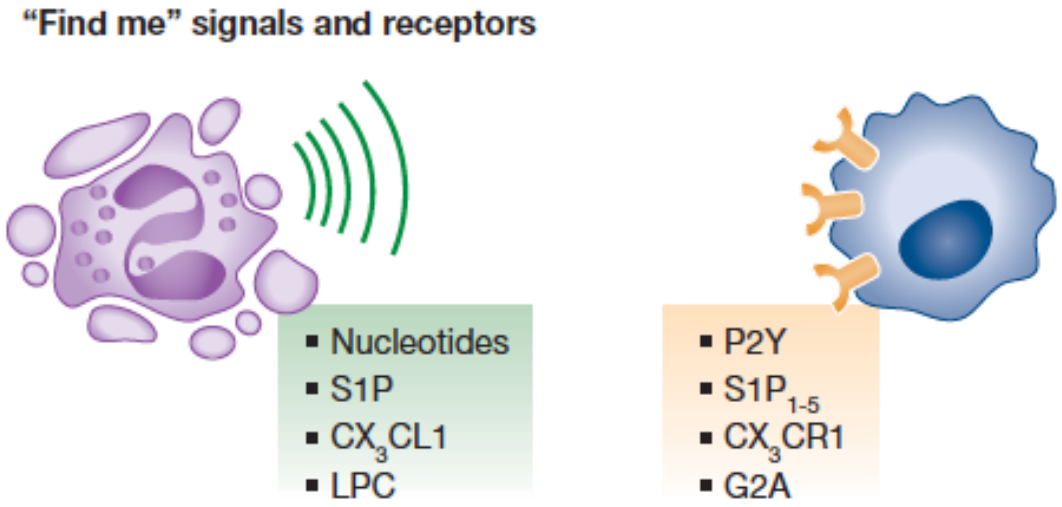
Riconoscimento dei neutrofili in apoptosi



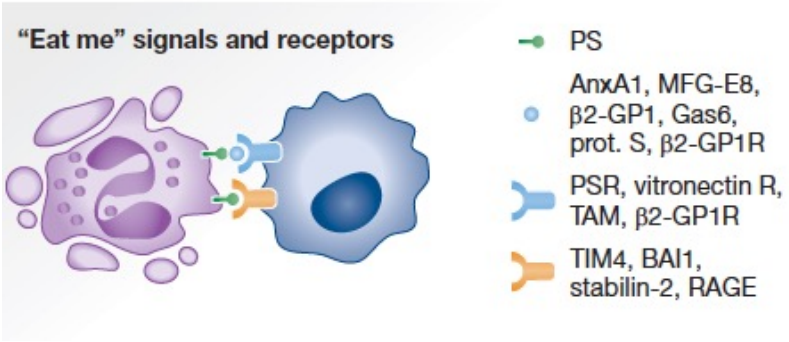
Durante l'apoptosi i neutrofili rilasciano segnali solubili nell'ambiente extracellulare che attirano i macrofagi e ne stimolano le capacità fagocitiche.

Questi segnali definiti «find me signals» includono:

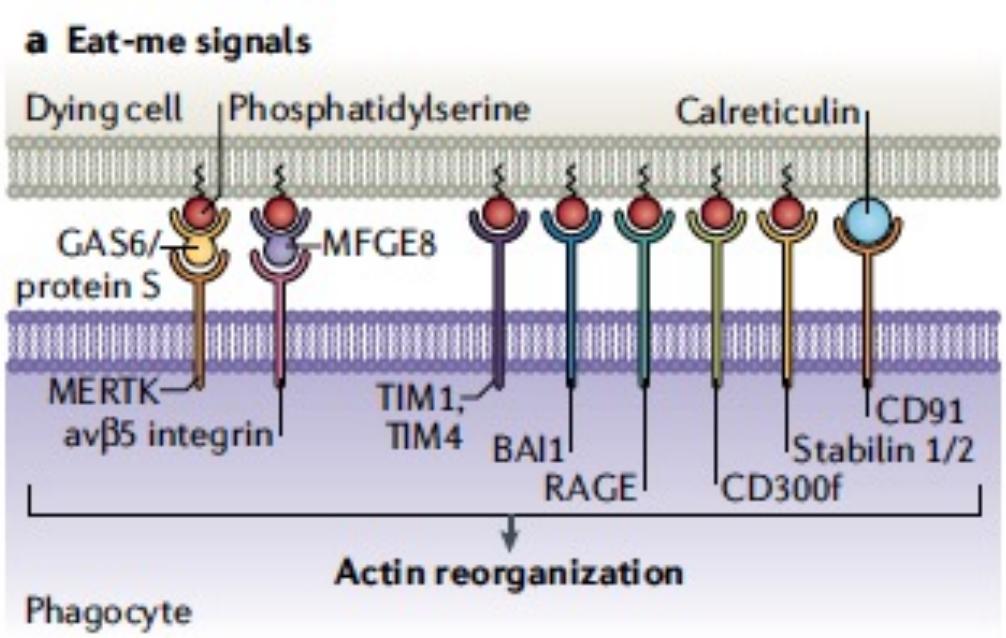
- Lipidi di membrana modificati quali la lisofosfatidil colina (LPC) e sfingosina-1-fosfato (S1P), ATP e chemochine
  Durante l'apoptosi la caspasi 3 scinde attivandola la PLA_2 che genera lisofosfatidil colina dalla fosfatidil colina. LPC è secreta dalla cellula mediate trasportatori. Queste molecole agiscono da fattori chemiotattici.



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.

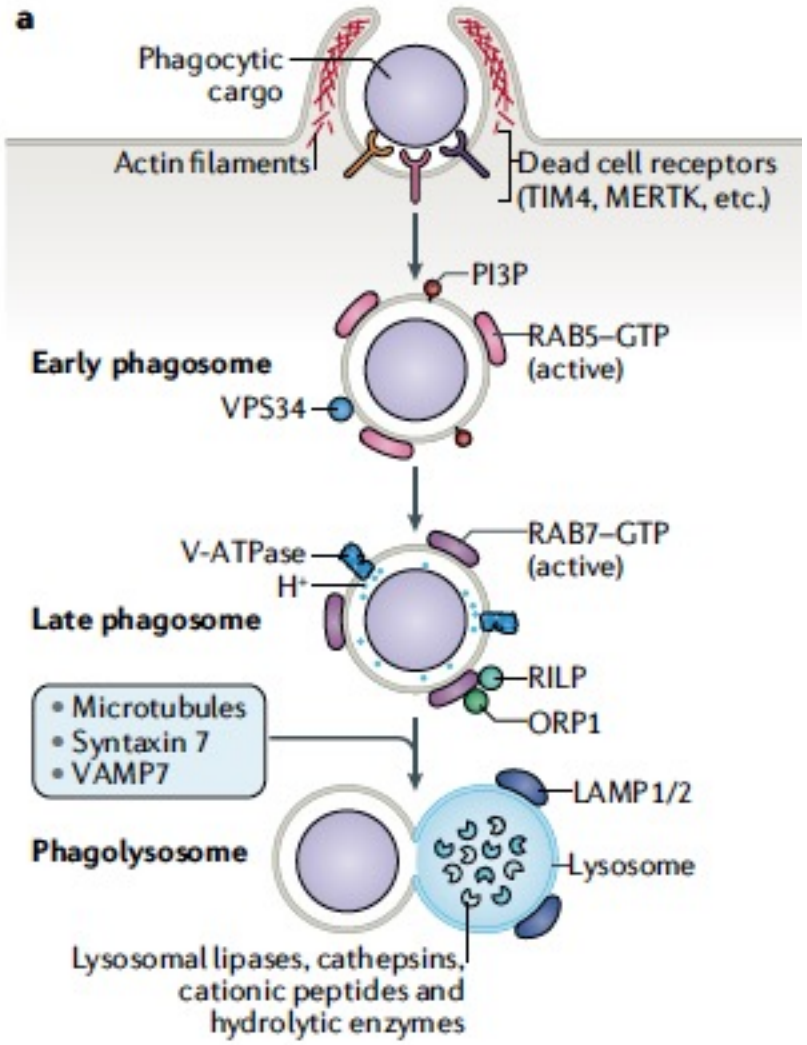


Le cellule morenti perdono l'asimmetria dei fosfolipidi di membrana (fosfatidil etanolammina e fosfatidil serina nello strato interno della membrana plasmatica) che è mediata dalla flippase ATP11 che confina la fosfatidilserina (PS) nello strato interno della membrana plasmatica e ne limita la mobilità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

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

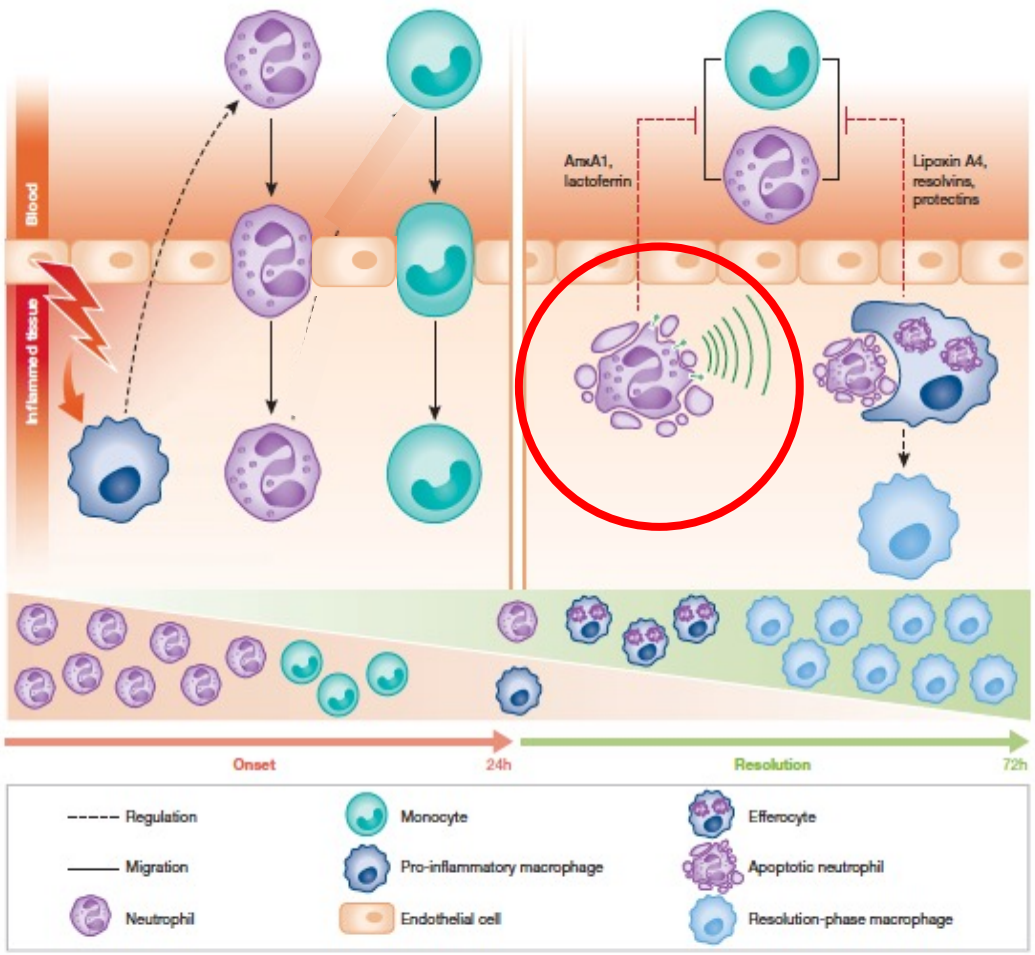


Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation. Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of 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.

I neutrofili morenti 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 di 37Kd che nei neutrofili trasloca sulla membrana plasmatica e viene poi secreta. ANXA1 sulle cellule lega i recettori per i peptidi formilati FPR).

  Sui neutrofili agisce bloccando la transmigrazione nei tessuti.

- Produzione di mediatori lipidici ad attività anti-infiammatoria come le lipossine.

Struttura dell'annessina-A1

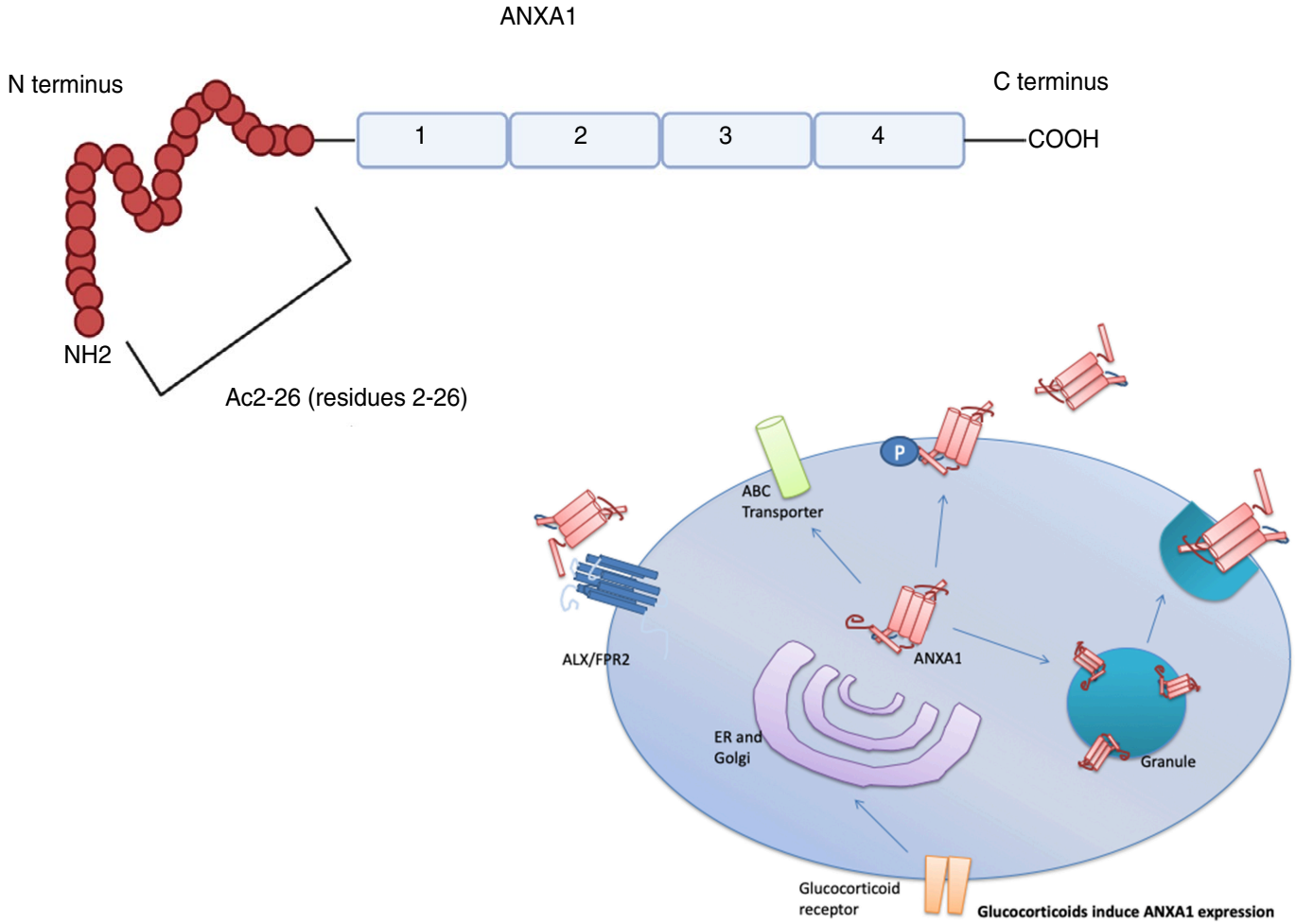
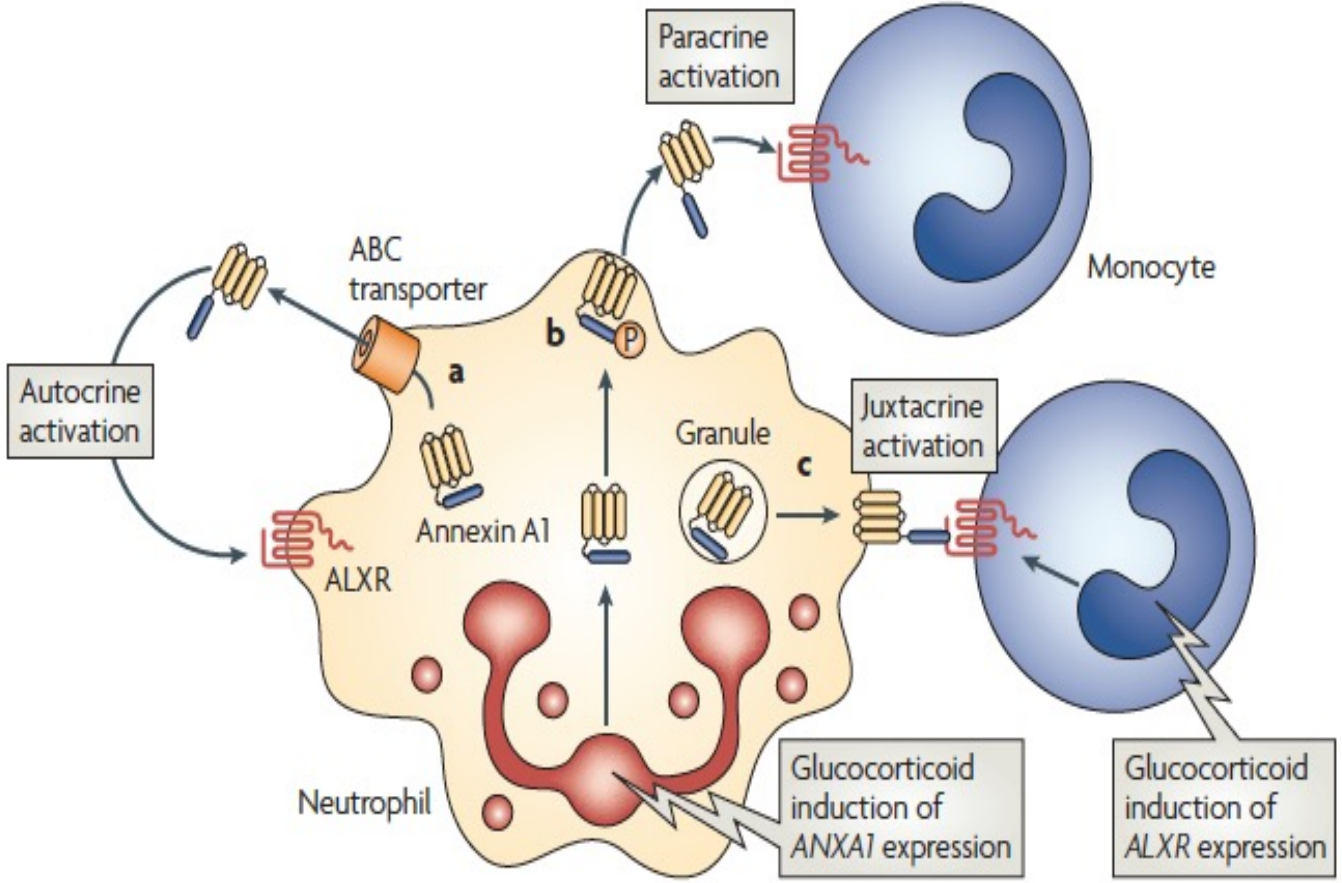


FIGURE 1 | Upon cellular activation, ANXA1 is mobilized to the plasma membrane and then secreted in one of three mechanisms depending in the cell type involved. These mechanisms are: (1) through the ATP-binding (ABC) transporter; (2) via direct phosphorylation of ANXA1 on serine-27 followed by membrane localization to the plasma membrane, and (3) fusion of ANXA1 loaded granules to the plasma membrane. Once released ANXA1 can act in an autocrine, paracrine, and juxtacrine manner to activate ALX/FPR2 signaling.

ANXA1 è composta da 4 domini che legano il Ca2+ e un dominio N-terminale. In presenza di calcio ANXA1 cambia la conformazione. L'esposizione della regione N-terminale permette l'interazione con il recettore FPR.

La proteina intracellulare a seconda della cellula può essere secreta in seguito a trasporto da parte di trasportatori, fusione dei granuli con la membrana plasmatica o in seguito a fosforilazione.

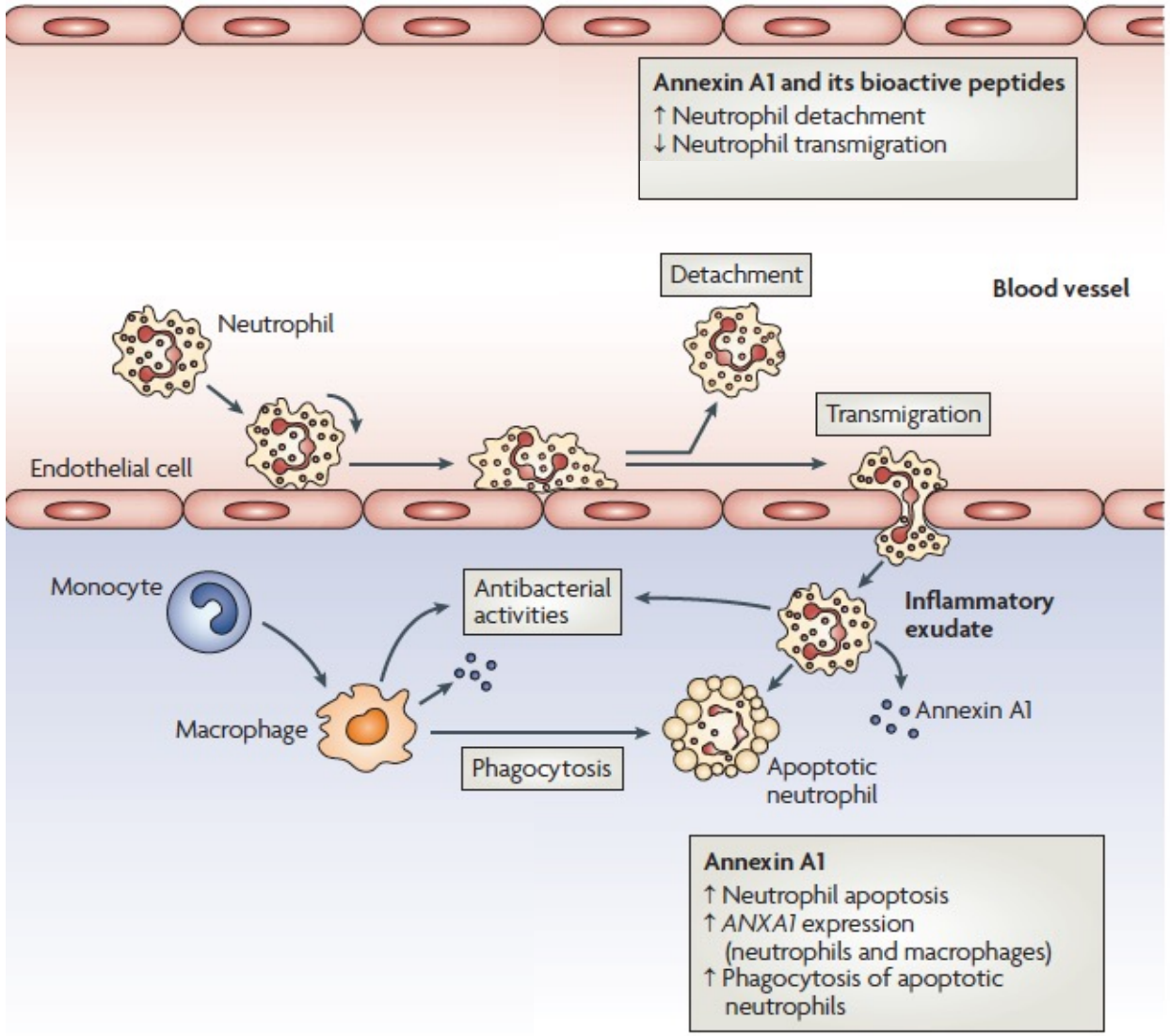
La proteina ANXA1 agisce sia sulla cellula che la produce che sulle cellule adiacenti.



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

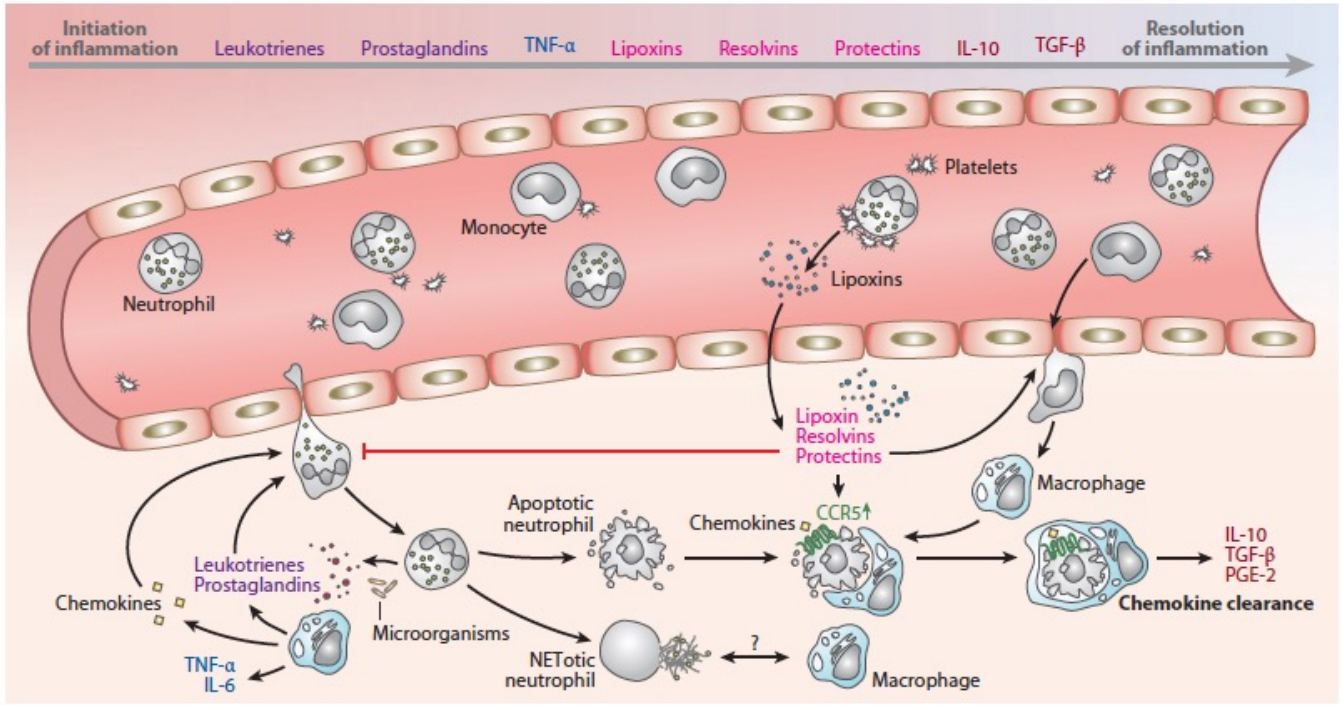
Meccanismi di azione dell'Annexin A1



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

Aumenta la fagocitosi dei neutrofili da parte dei macrofagi

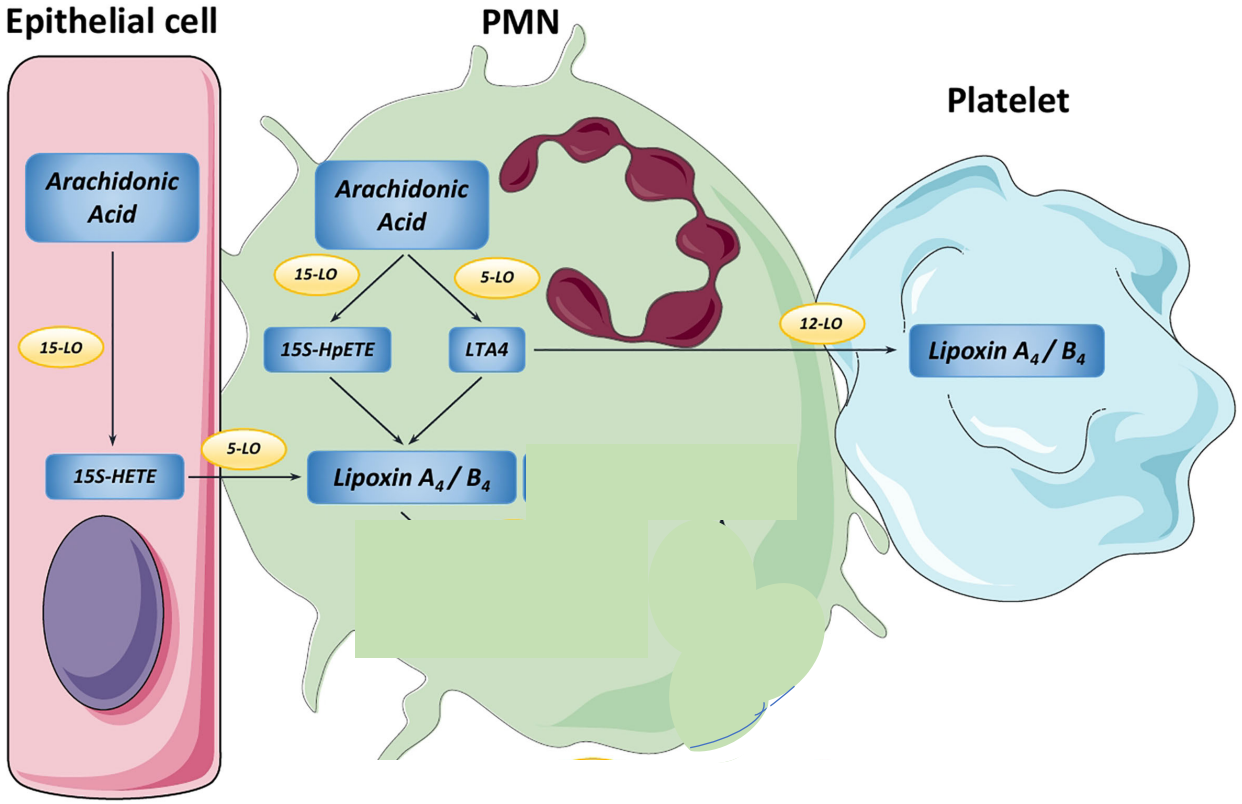
I neutrofili e la risoluzione dell'infezione



Durante le fasi precoci del processo infiammatorio i neutrofili producono leucotrieni e prostaglandine successivamente queste cellule smettono di produrre leucotrieni e producono lipossine e resolvine.

Dopo aver eseguito la loro funzione microbicida i neutrofili vanno incontro a morte per apoptosi. La rimozione dei corpi apoptotici viene mediata dai macrofagi.

Mediatori lipidici promuoventi la risoluzione dell'infiammazione



La risoluzione dell'infezione si accompagna alla sintesi di mediatori lipidici ad attività anti-infiammatoria da parte dei neutrofili.

Le lipossine sono derivati dell'acido arachidonico e possono essere prodotte dai neutrofili nel sito infiammato attraverso 2 vie.

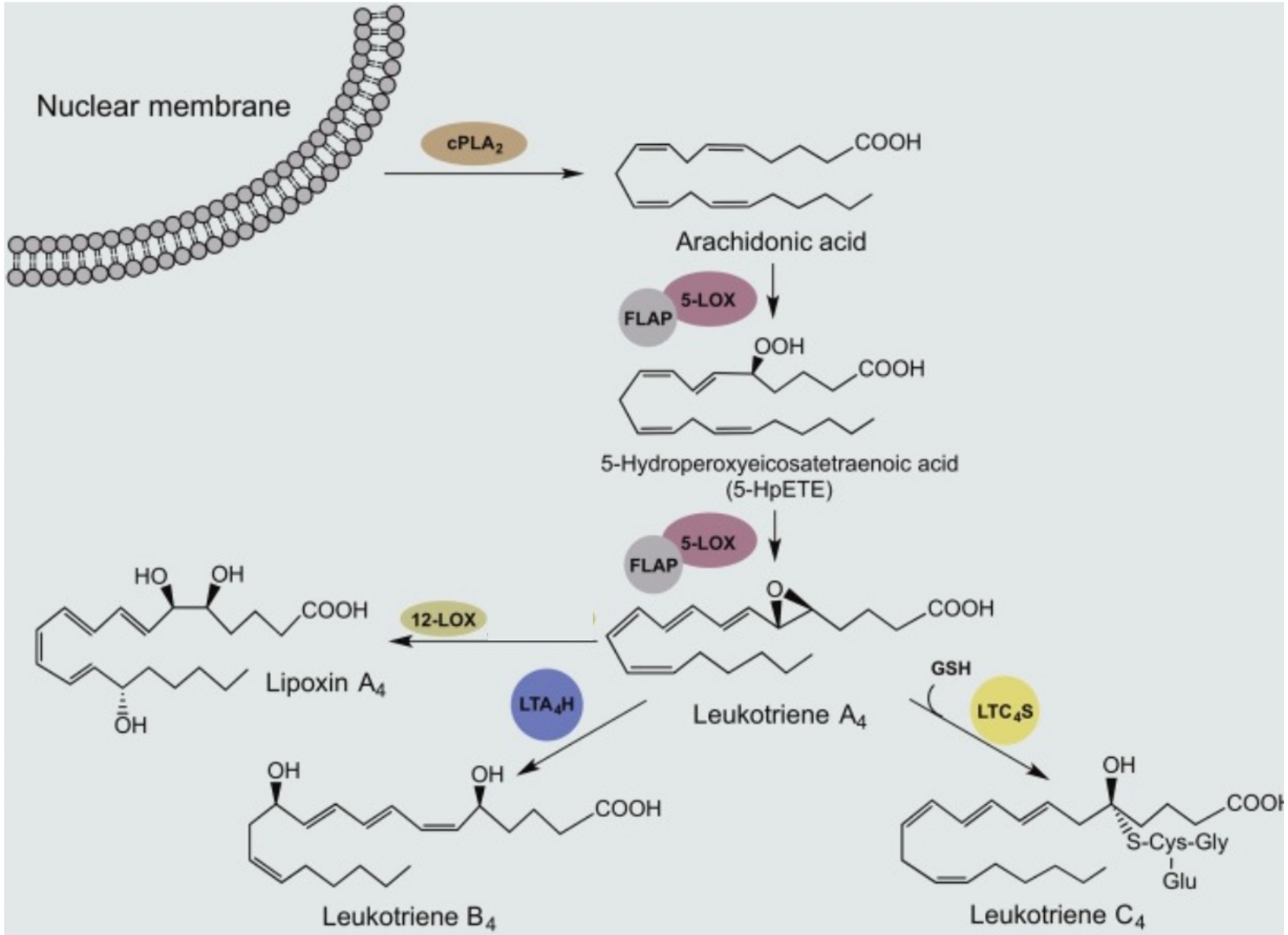
- L'acido arachidonico è convertito in LTA4 (leucotriene A4) da parte della 5-lipossigenasi e successivamente sono prodotte le lipossine per azione della 12-LO

- L'acido arachidonico è convertito in 15(S)-HpETE (acido idroperossieicosatetraenoico) da parte della 15-lipossigenasi e successivamente sono prodotte le lipossine A4/B4. La 15-lipossigenasi è indotta nei neutrofili esposti alla PGD_2 e PGE_2.

Le lipossine:

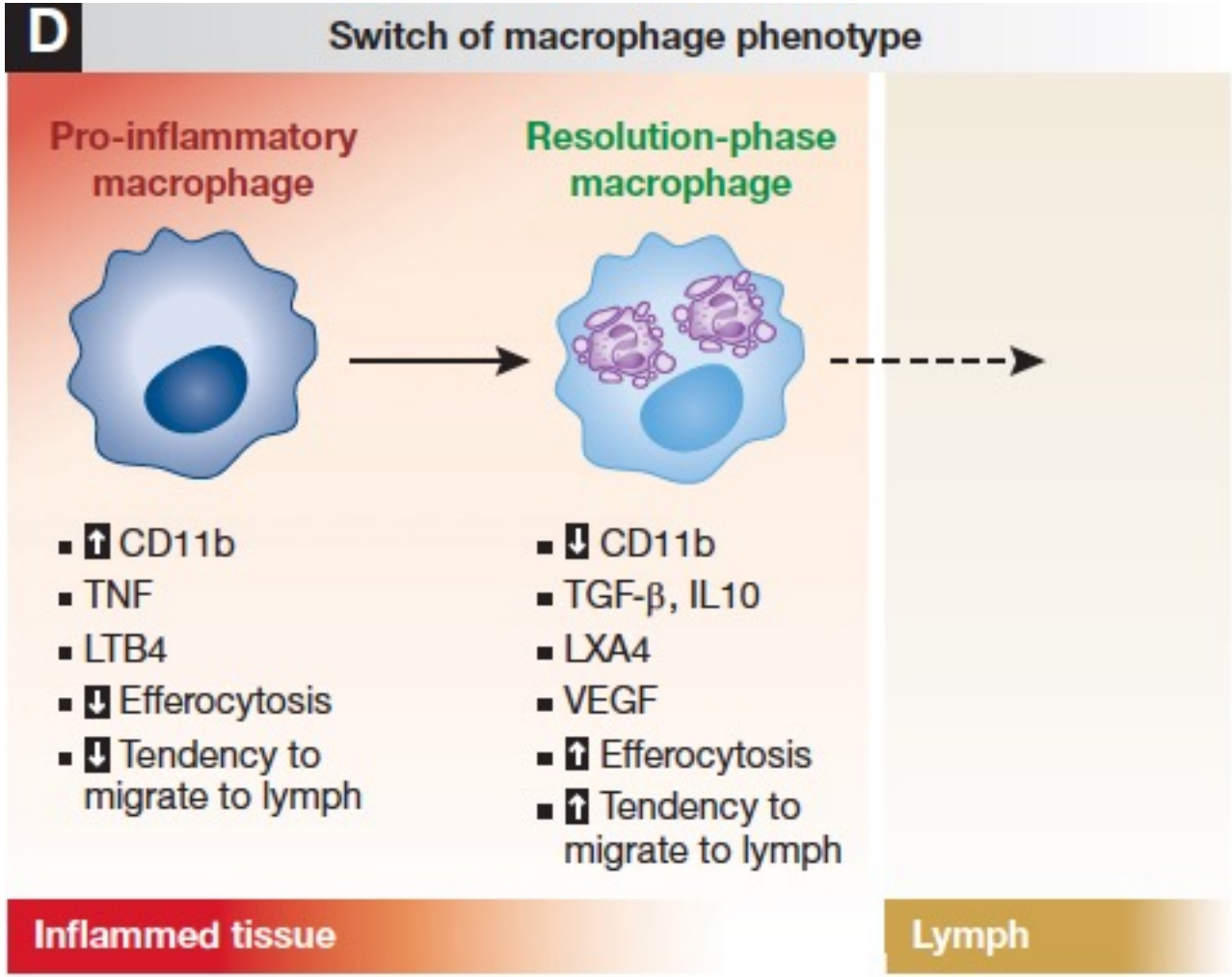
- Bloccano la migrazione dei neutrofili nei tessuti
- Bloccano la produzione di TNF-α da parte dei leucociti
- Promuovono la efferocitosi dei macrofagi

Le lipossine possono anche essere prodotte per via transcellulare cioè con il contributo di due cellule diverse come cellule epiteliali (15-LO/leucociti (5-LO) o leucociti (5-LO)/piastrine (12-LO).



LTA_4H=leucotriene A4 idrolasi

Cambiamento funzionale dei macrofagi durante la risoluzione dell'infiammazione



Durante l'efferocitosi dei neutrofili apoptotici i macrofagi rilasciano molecole ad attività anti-infiammatoria 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).

Cambiamento funzionale dei macrofagi durante la risoluzione dell'infiammazione

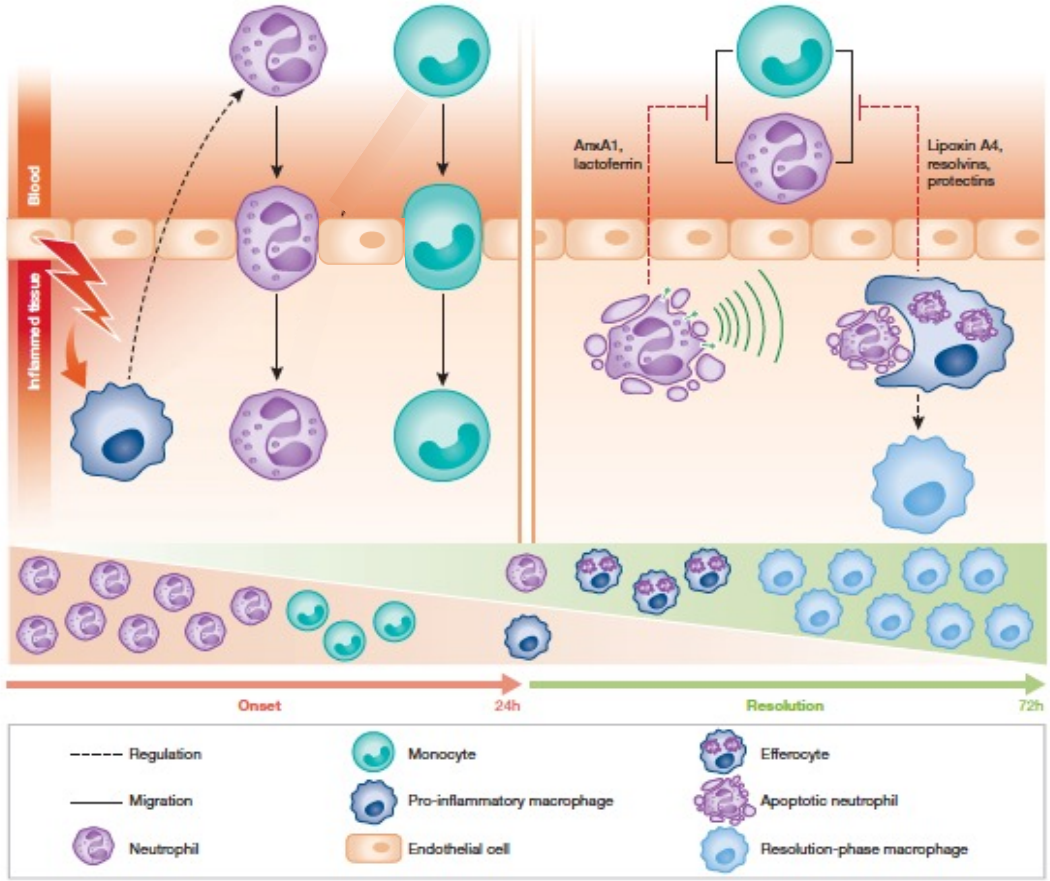
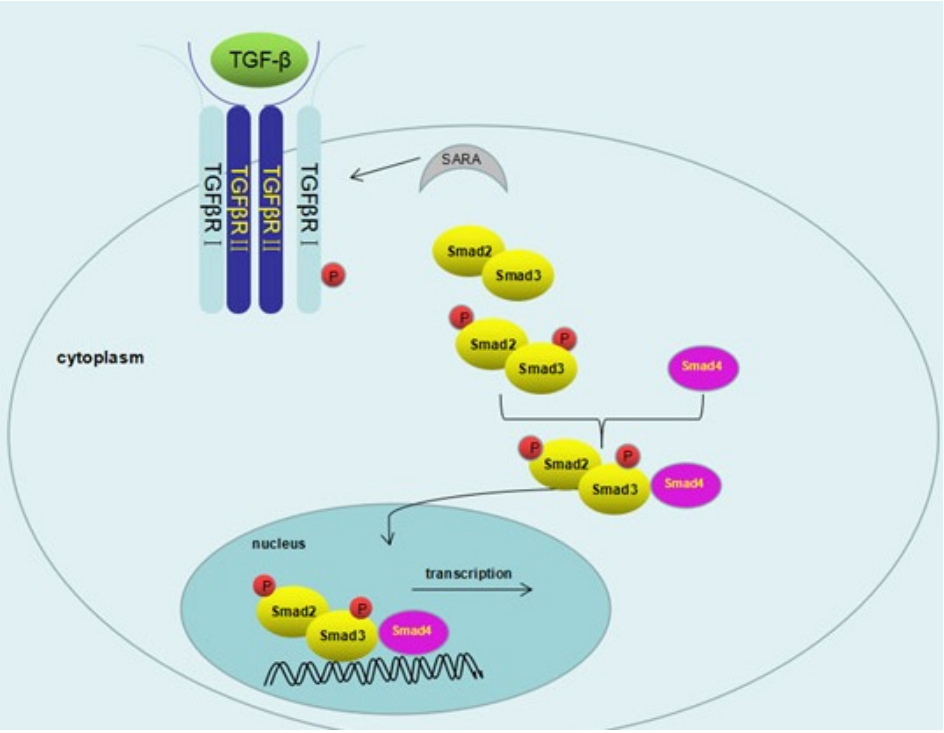


Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation. Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of 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.

Azione del TGF-β e IL-10



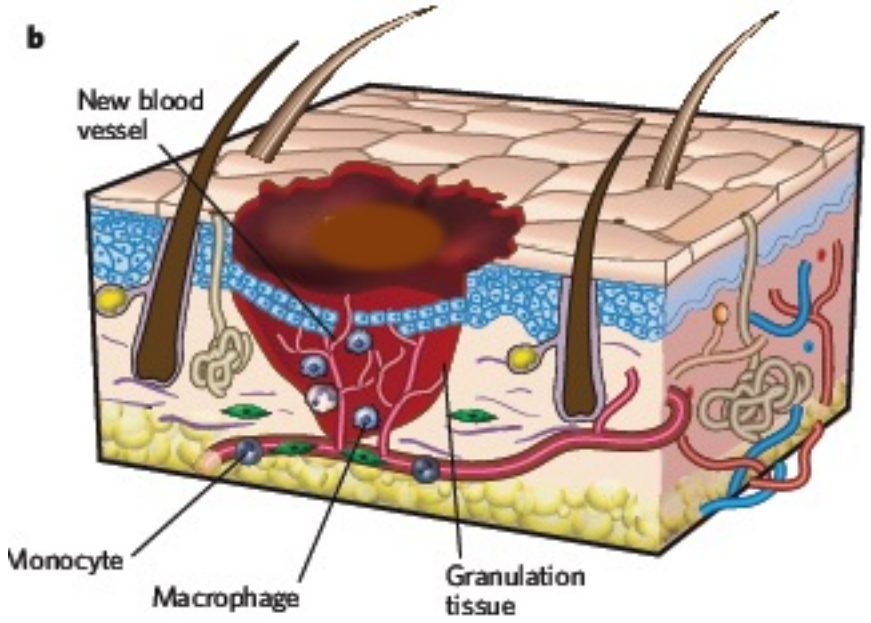
L'IL-10 inibisce l'attività dei macrofagi

I TGF-β (Fattore di crescita trasformante) sono una famiglia di citochine strettamente correlate denominate TGF-β1, -β2,-β3. Il TGF-β1 è sintetizzato come precursore inattivo che deve essere scisso per formare un omodimero. Il recettore del TGF-β1 (serin treonin chinasi) è costituito da due catene coinvolte nella fosforilazione dei fattori di trascrizione della famiglia SMAD.

Il TGF-β1

- 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

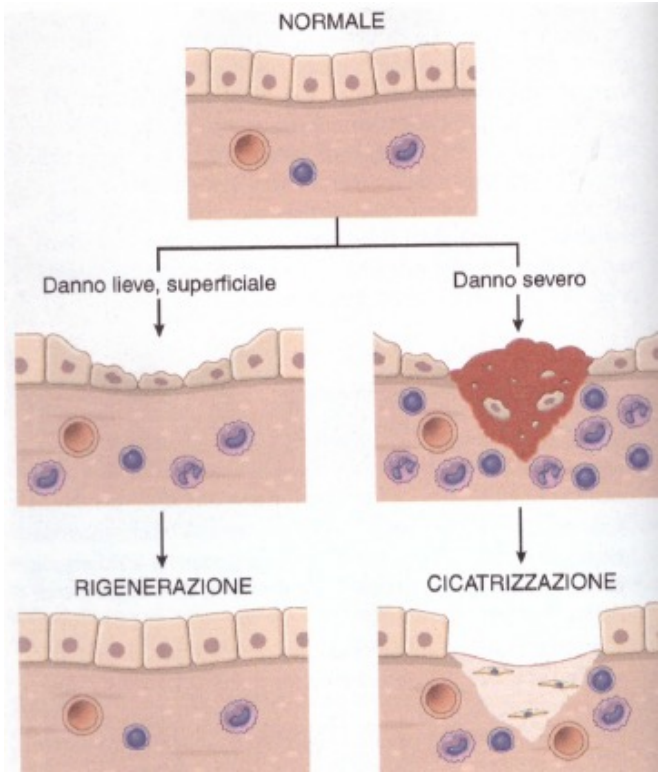
Riparazione



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**: rispristino delle cellule normali. Alcuni tessuti sono in grado di sostituire le componenti danneggiate con tessuto identico a quello leso. 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

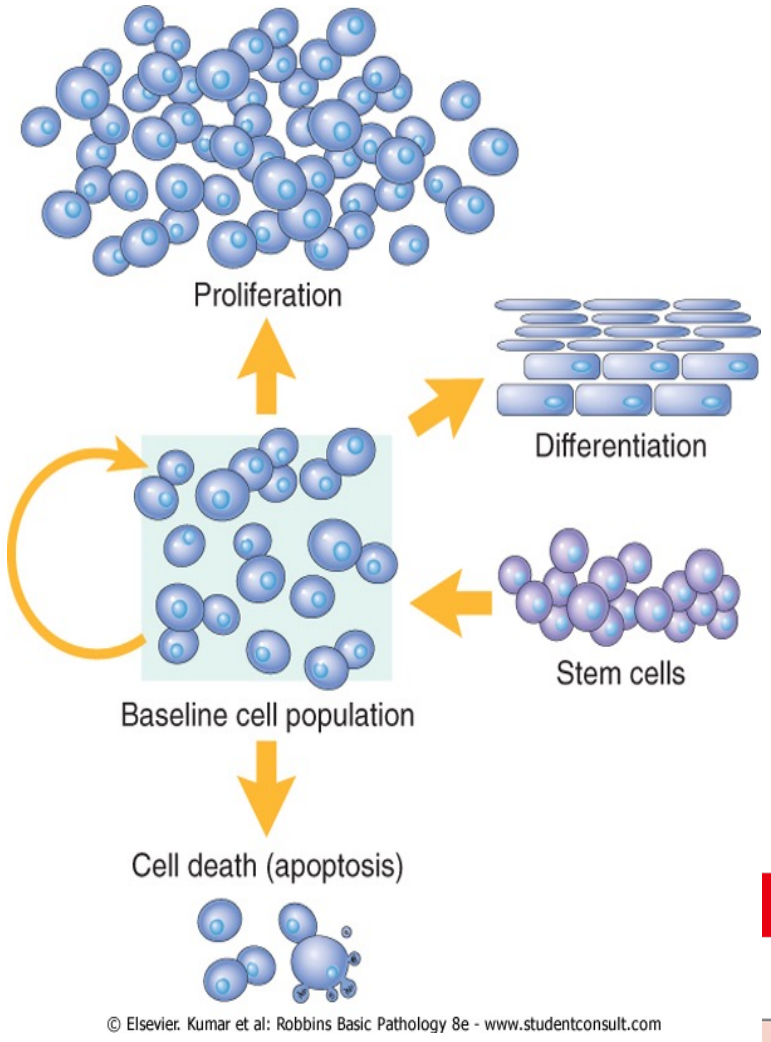
La capacità dei tessuti di riparare è influenzata dalla capacità proliferativa intrinseca, i tessuti possono essere distinti in:

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 epiteli di superficie: della pelle; dei dotti escretori delle ghiandole esocrine (pancreas, ghiandole salivari..); del tratto intestinale, dell'utero.

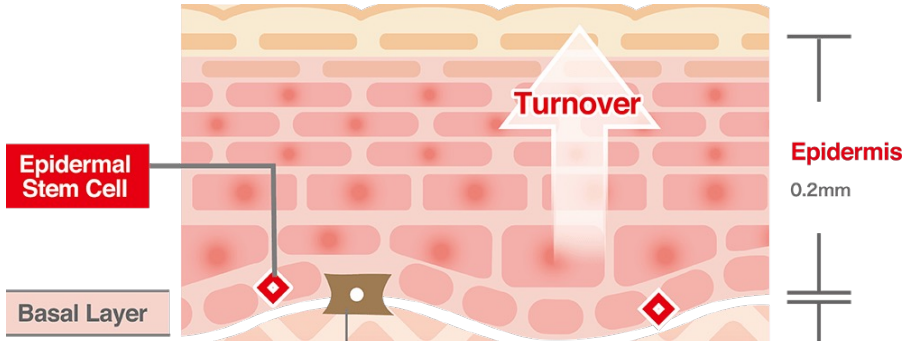
Tessuti stabili: le cellule di questi tessuti sono quiescenti e hanno una minima attività replicativa in condizioni normali. In risposta al danno o alla perdita di massa tissutale le cellule del tessuto hanno la capacità di proliferare. Le cellule stabili si trovano nel fegato, nel rene e sono cellule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

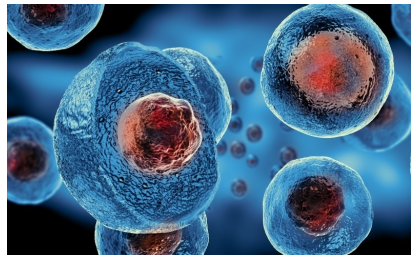


Nei tessuti che si rigenerano, le cellule mature sono cellule differenziate terminali. Quando le cellule mature muoiono sono rimpiazzate dalla differenziazione di nuove cellule che derivano dalle cellule staminali. La normale dimensione numerica delle popolazioni cellulari è determinata dall'equilibrio 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

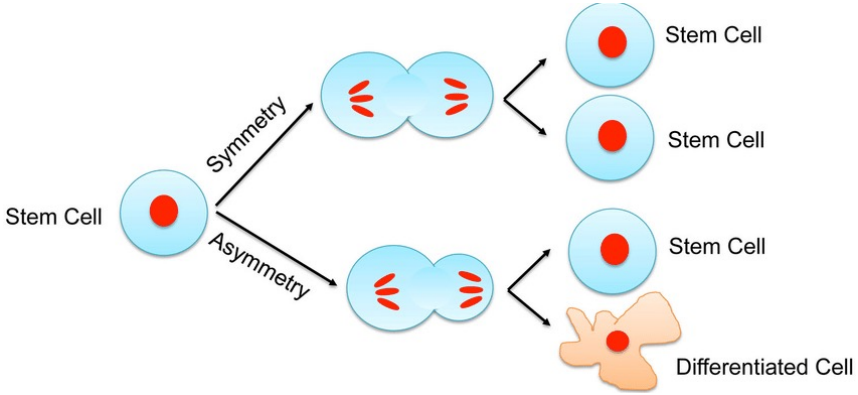


Le cellule staminali sono caratterizzate da:

i) capacità di autorinnovarsi

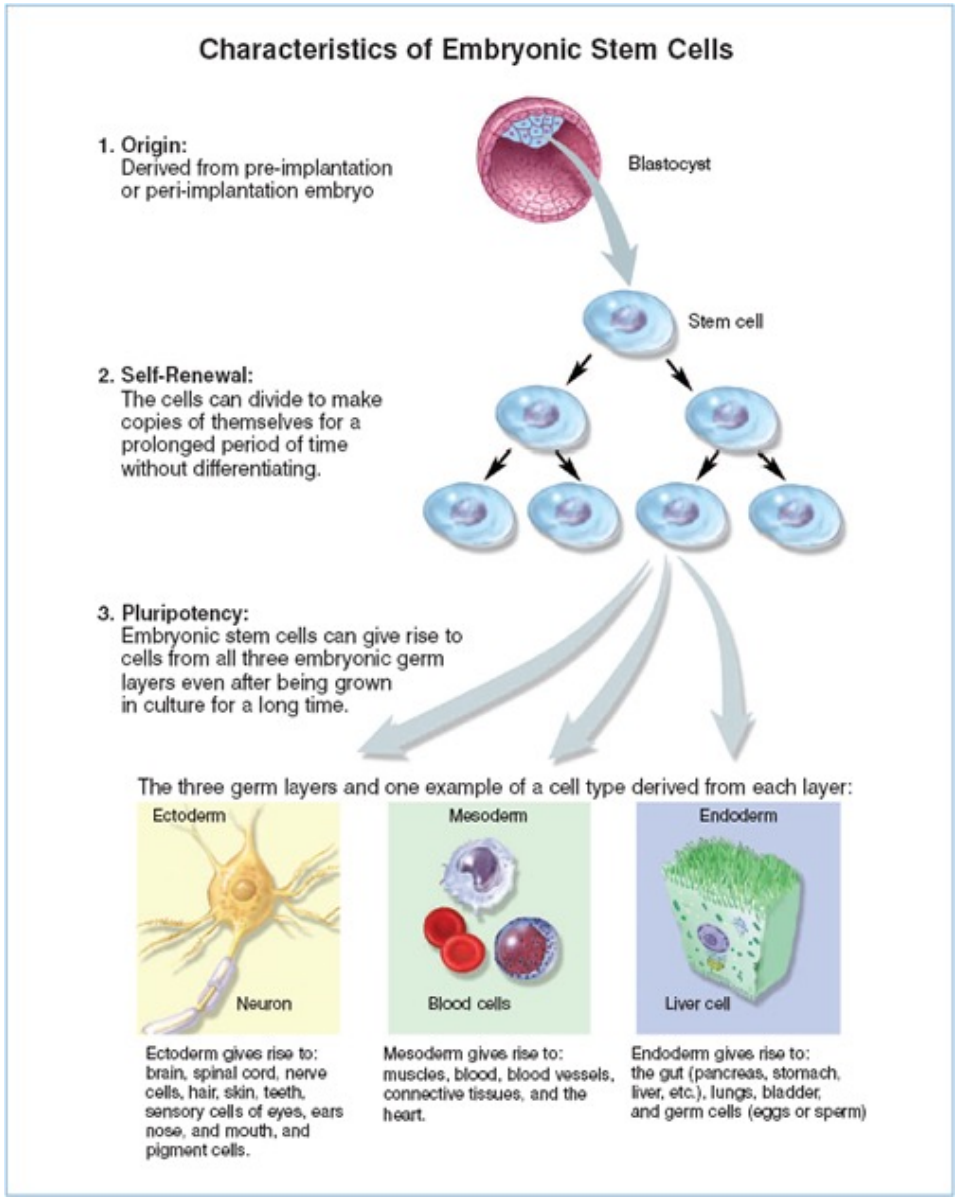
ii) replicazione asimmetrica

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



Le cellule staminali vanno incontro a divisione simmetrica o asimmetrica. Quando una cellula staminale va incontro a divisione simmetrica, questa da origine a due cellule identiche alla cellula madre. Nella divisione asimmetrica la cellula staminale che si divide da origine a una cellula che è identica alla cellula madre e a una cellula con potenziale più ristretto. It is generally believed that most, if not all, of stem cells that reside in the body undergo asymmetric division to maintain tissue homeostasis.

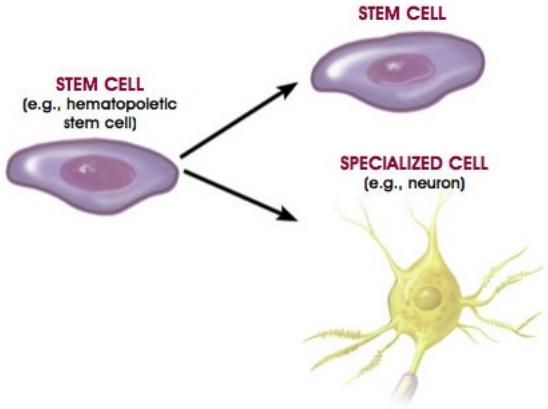
Cellule staminali embrionali e adulte



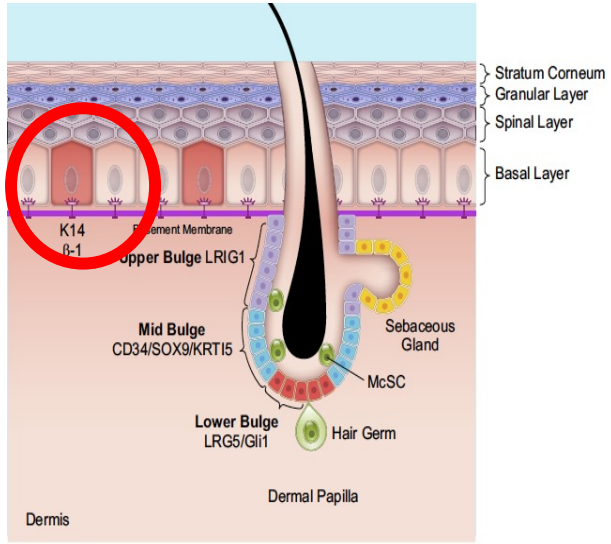
Le cellule staminali embrionali (ES) sono presenti all'interno della blastocisti e hanno una grande capacità di autorinnovamento. In appropriate condizioni di coltura possono dare origine a cellule che derivano da tutti e tre i foglietti embrionali. Le ES danno origine alle cellule di tutto il corpo.

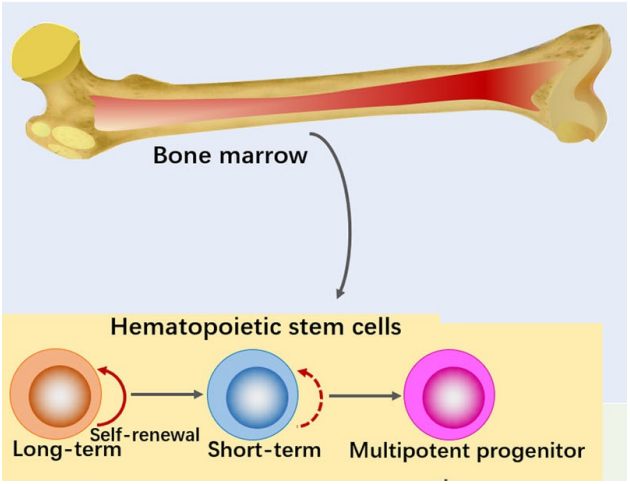
Le cellule staminali adulte si trovano fra le cellule differenziate all'interno di un tessuto e hanno un potenziale di differenziazione più ristretto.

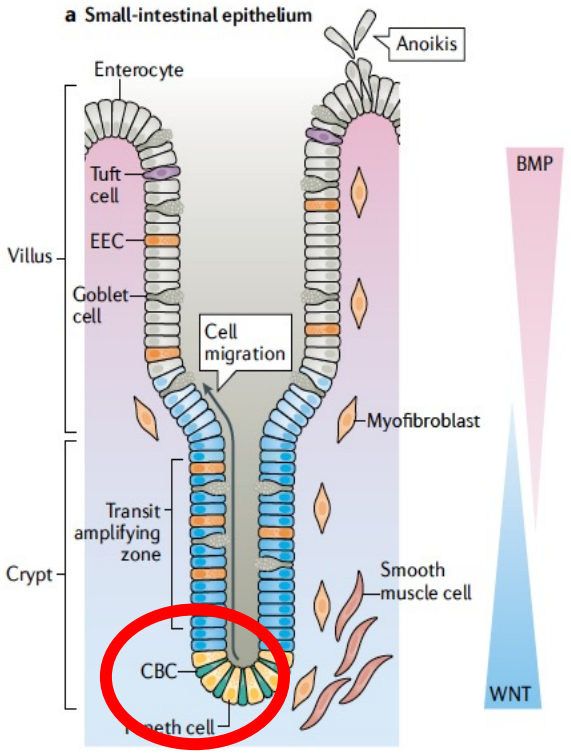
Adult stem cell



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.