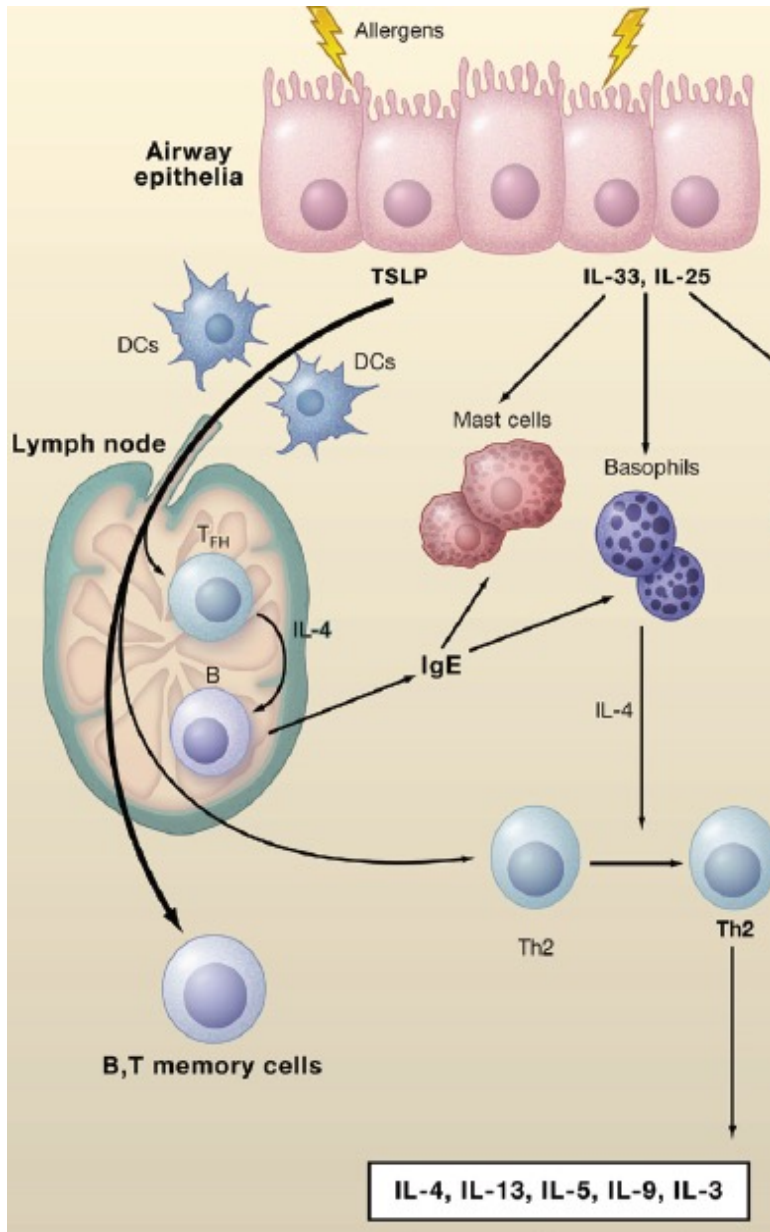


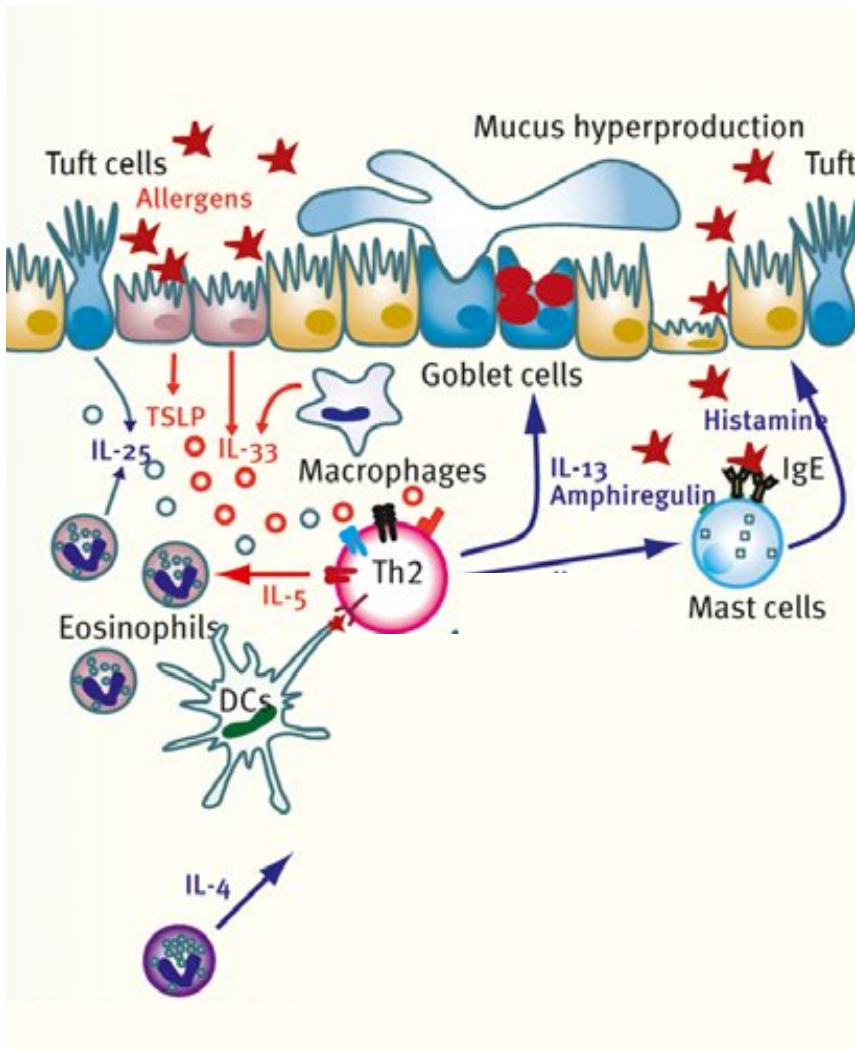
Fase di sensibilizzazione



In un soggetto allergico il primo incontro con l'allergene induce una risposta anticorpale o umorale caratterizzata dalla produzione di IgE.

Inoltre sono indotti linfociti T helper 2 che sono caratterizzati dalla produzione di IL-4, IL-5, IL-9, IL-13.

I linfociti Th2 mediano la risposta infiammatoria nelle reazioni allergiche



L'infiammazione allergica caratterizza le malattie allergiche quali l'asma, le rinosinuiti, la dermatite atopica.

L'infiammazione allergica è caratterizzata dal reclutamento di eosinofili, linfociti Th2, iperproduzione di muco e iperreattività bronchiale.

I linfociti Th2 attraverso la produzione delle citochine IL-4, IL-5, IL-13 mediano tali processi.

Sviluppo delle sottopopolazioni di linfociti T helper

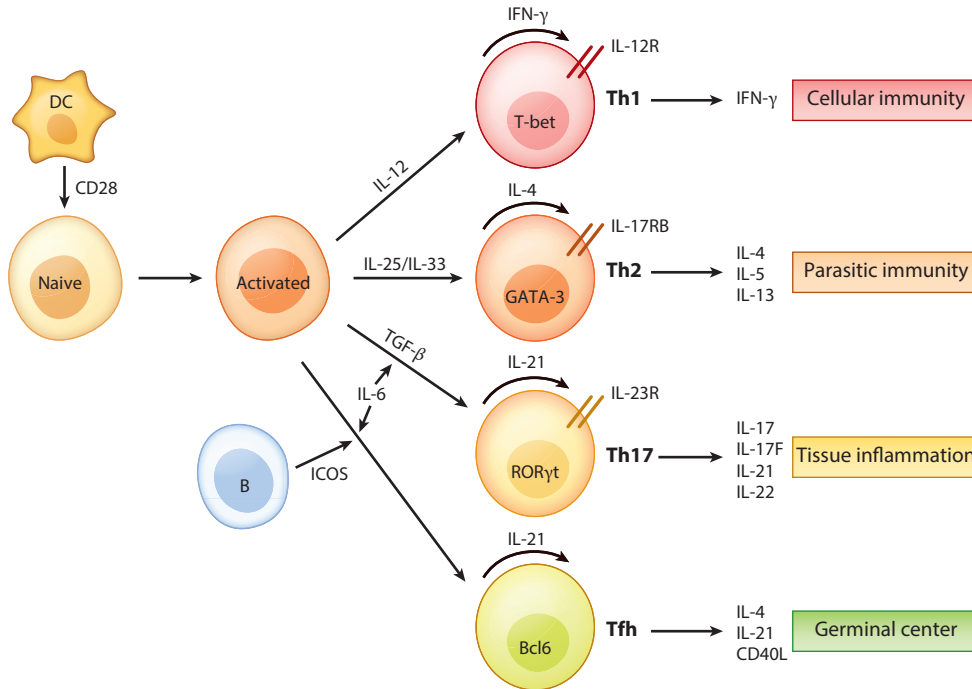
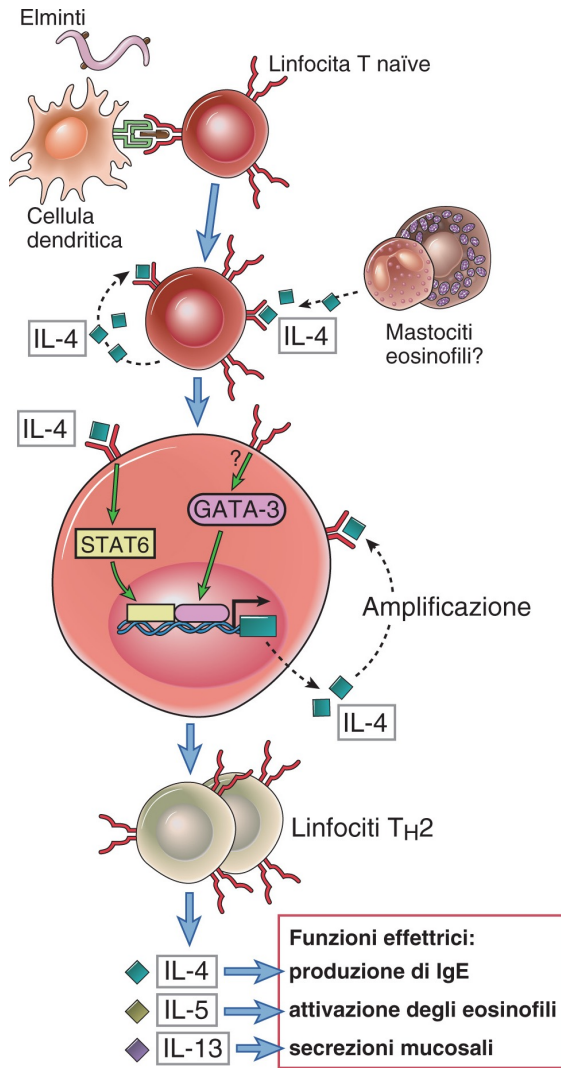


Figure 1

Development of Th subsets. In the presence of distinct antigen-presenting cells and innate cytokines, naive CD4⁺ T cells differentiate into effector Th cells that are characterized by their expression of distinct cytokines and transcription factors. These cells have differential immune functions. Abbreviations: DC, dendritic cell; RORγt, RAR-related orphan receptor gamma; Tfh, T follicular helper; Th, T helper.

Il differenziamento dei linfociti T naive in linfociti appartenenti alle diverse sottopopolazioni richiede il riconoscimento dell'antigene presentato dalle cellule dendritiche (DC), la co-stimolazione e la presenza di citochine specifiche.

Il differenziamento dei Th2

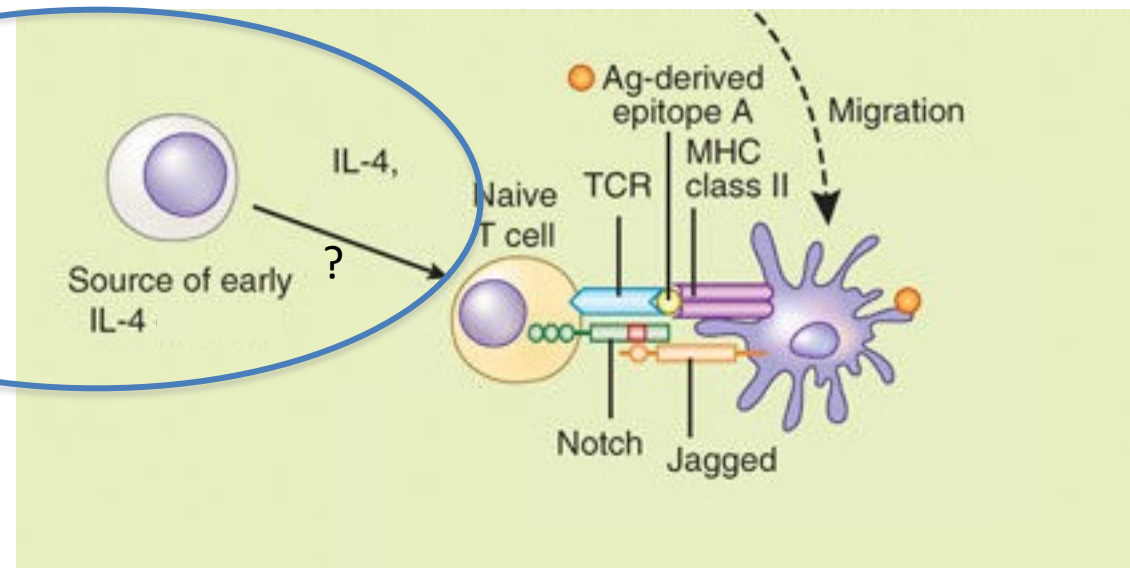


I linfociti Th2 si sviluppano dai linfociti T naïve in seguito al riconoscimento del complesso MHC+peptide espresso dalle cellule dendritiche in presenza di IL-4.

L'IL-4 agisce sui linfociti T helper attivando il fattore di trascrizione STAT6.

STAT6 attivato insieme ai segnali generati dal TCR induce l'espressione del fattore trascrizionale GATA-3. GATA-3 è il principale regolatore del differenziamento dei linfociti Th2 attivando la trascrizione dei geni che codificano per le citochine IL-4, IL-5 e IL-13.

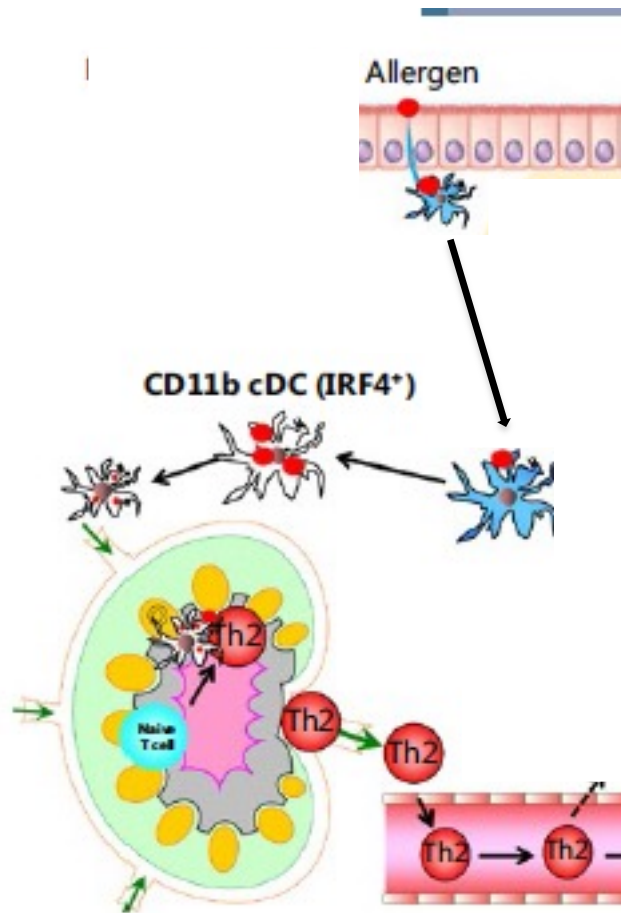
Perché gli allergeni inducono il differenziamento dei linfociti Th naive in Th2?



Il differenziamento dei linfociti T naive in Th2 richiede il riconoscimento dell'antigene presentato dalle DC e la presenza di IL-4.

Ad oggi ancora non è nota la popolazione cellulare responsabile della produzione di IL-4.

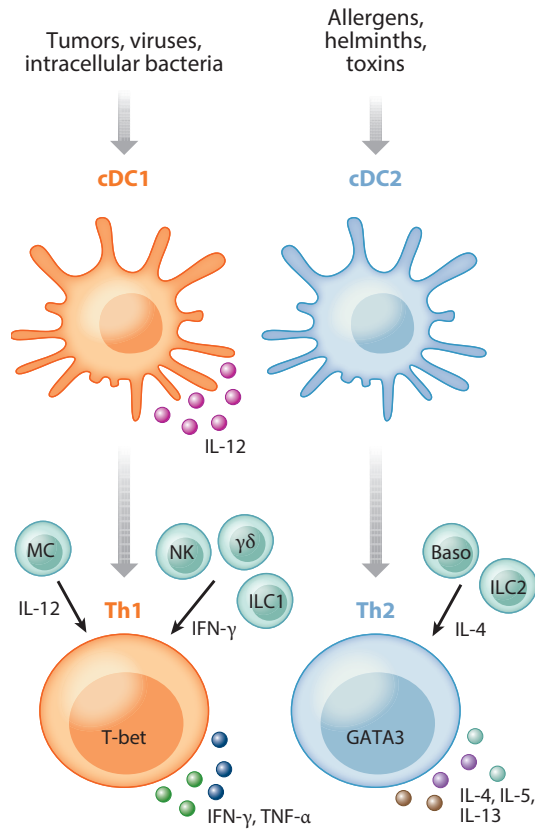
Particolari sottopopolazioni di cellule dendritiche convenzionali potrebbero essere responsabile del differenziamento dei Th2 nelle reazioni allergiche



Studi nel topo hanno dimostrato che il differenziamento dei linfociti Th2 specifici per allergeni dell'acaro della polvere è mediata dalla sottopopolazione di DC convenzionali cDC CD11b+.

In tale modello sperimentale è stato dimostrato che in seguito ad esposizione all'allergene queste cellule sono le uniche in grado di migrare nei linfonodi e di indurre risposte Th2.

Sottopopolazioni di cellule dendritiche convenzionali

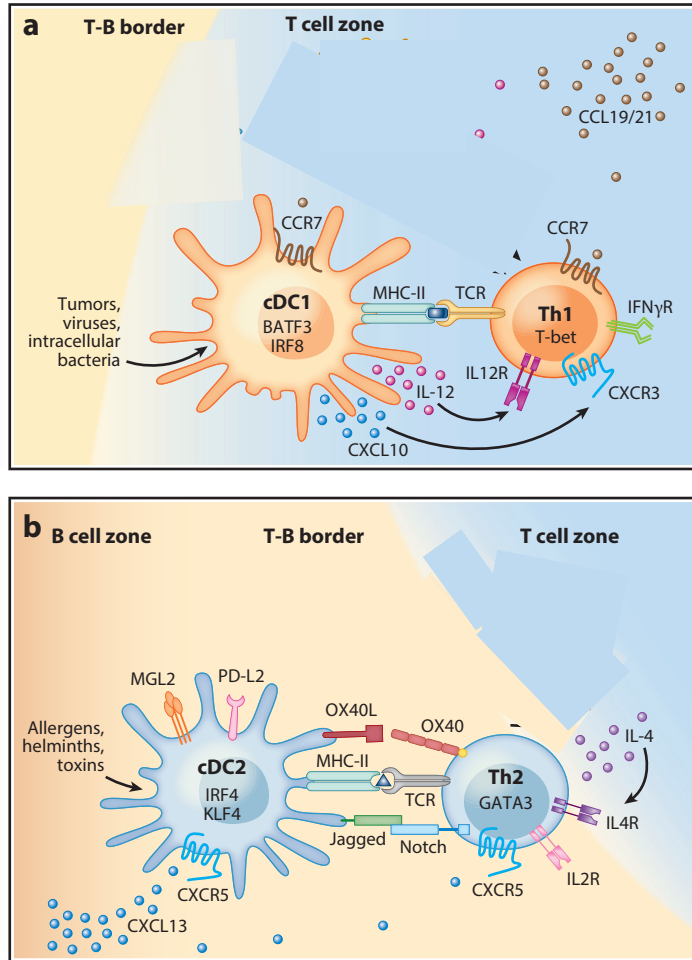


Le cellule dendritiche convenzionali sono distinte in 2 principali sottotipi:

cDC1 (CD8+, CD103+) = DC migratorie o residenti negli organi linfoidi. Il loro sviluppo dipende dai fattori di trascrizione IRF8, Batf3. Hanno una maggiore capacità di cross-presentare gli antigeni. Attivano i T CD8+. Producono IL-12.

cDC2 (CD11b+)= DC migratorie o residenti. Il loro sviluppo dipende dal fattore trascrizionale IRF4. Attivano i linfociti T CD4+.

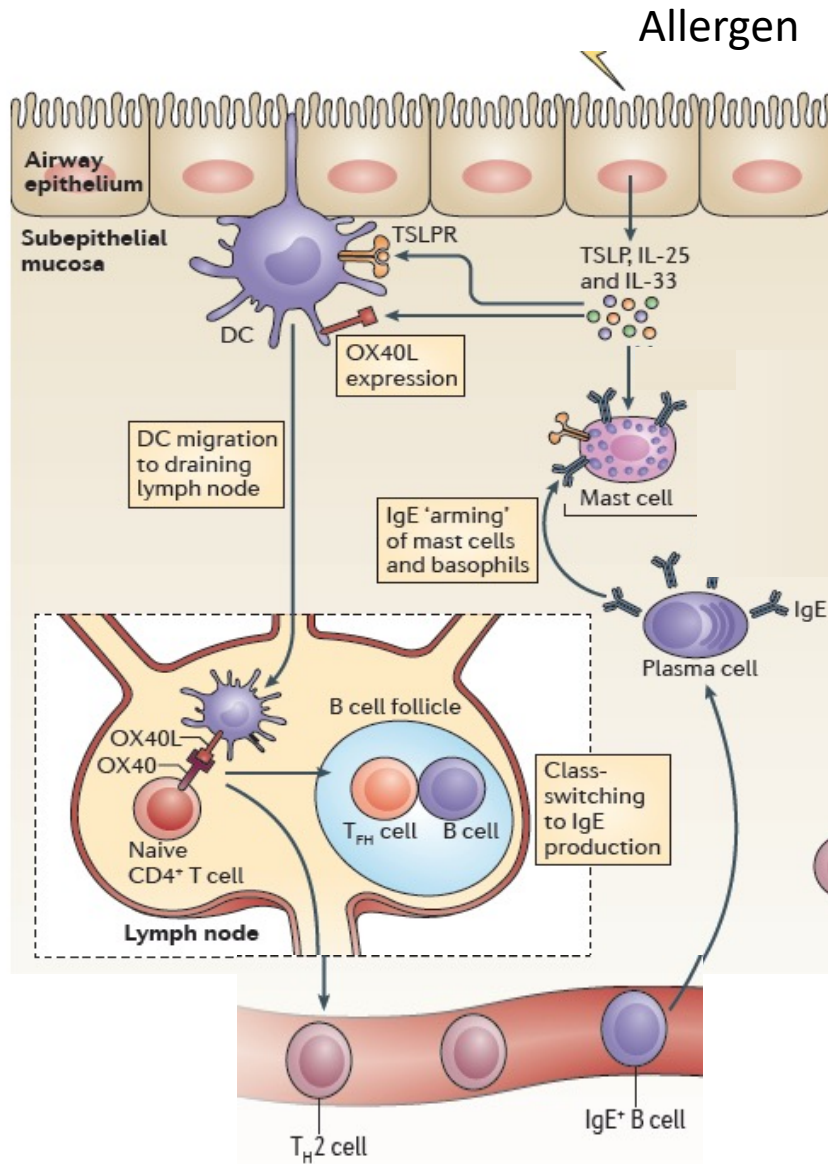
Induzione dei Th1 o dei Th2 dalle DC



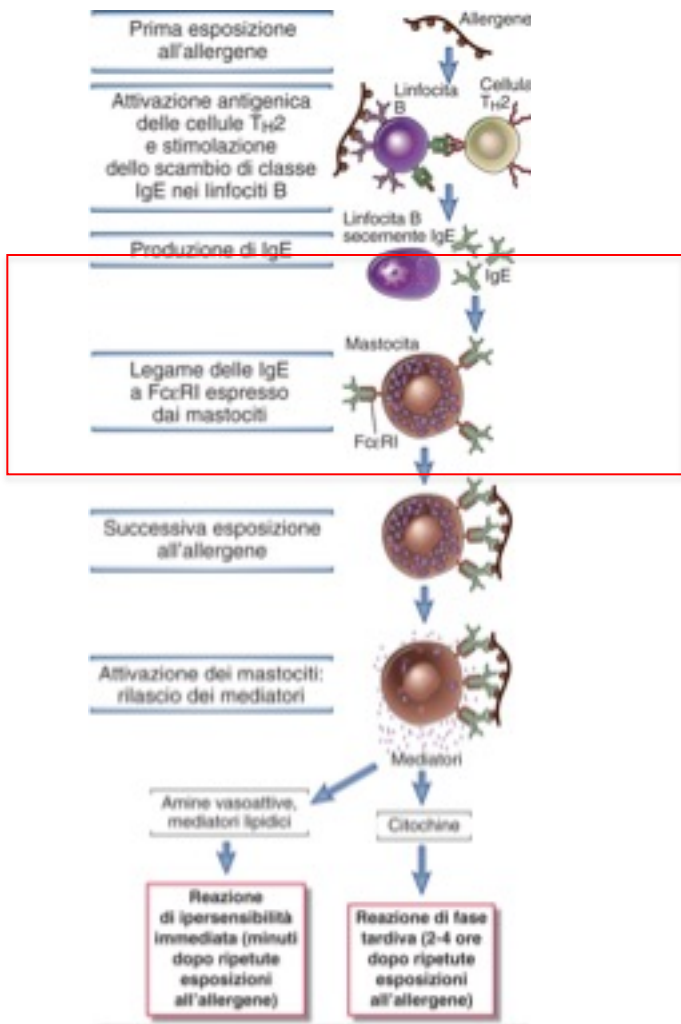
Interazioni a bassa affinità fra il TCR e l'antigene o basse dosi di antigene promuovono lo sviluppo delle risposte Th2. La produzione di basse dosi di IL-4 da parte del linfocita T stesso è sufficiente ad indurre le Th2.

La minor produzione di IL-12 da parte delle cDC2 favorisce lo sviluppo dei Th2.

Segnali inviati dalle cellule epiteliali istruiscono le cellule dendritiche a favorire la polarizzazione dei linfociti T in Th2

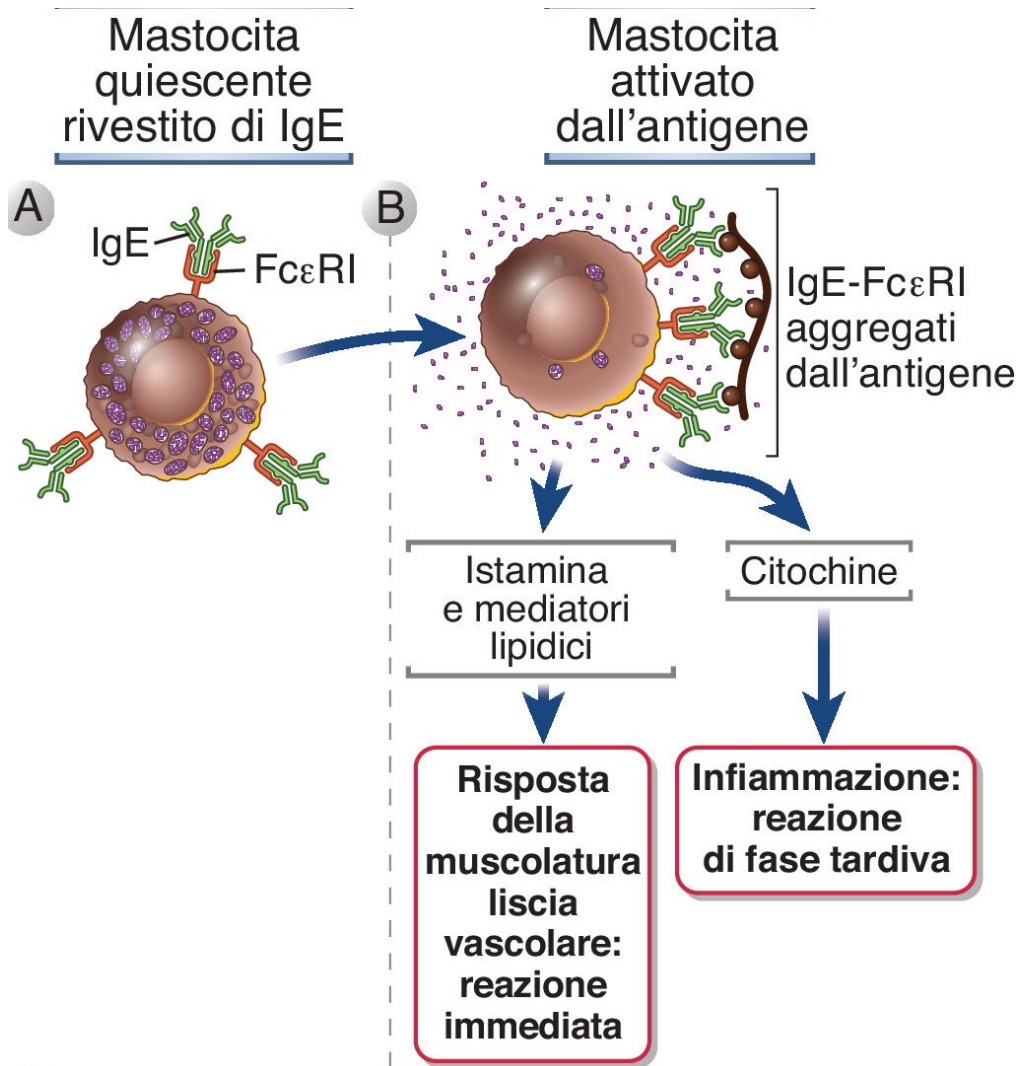


In seguito all'interazione con l'allergene, le cellule epiteliali producono TSLP (thymic stromal lymphopoietin), IL-33, IL-25. Il TSLP media la migrazione e l'attivazione delle cellule dendritiche. Esso induce l'espressione di OX40L sulle cellule dendritiche, inibendo la produzione di IL-12. L'interazione dei linfociti T naive con le DC attivate dall'allergene favorisce lo sviluppo dei linfociti T competenti a produrre IL-4 (Th2).



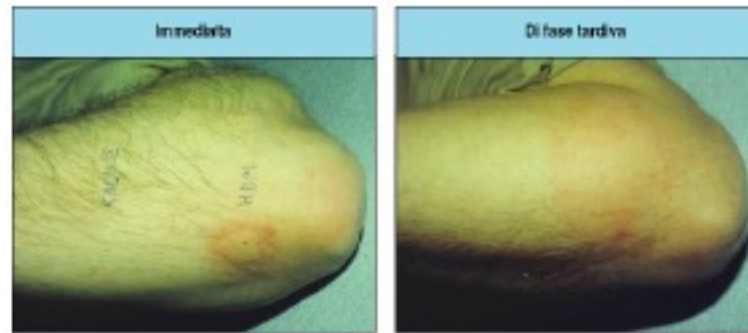
Le IgE prodotte in seguito alla prima esposizione all'allergene circolano nei fluidi corporei e si legano a recettori ad alta affinità ($Fc\epsilon R1$) per le IgE espressi dai mastociti e dai basofili

L'interazione fra allergene e IgE determina l'attivazione dei mastociti



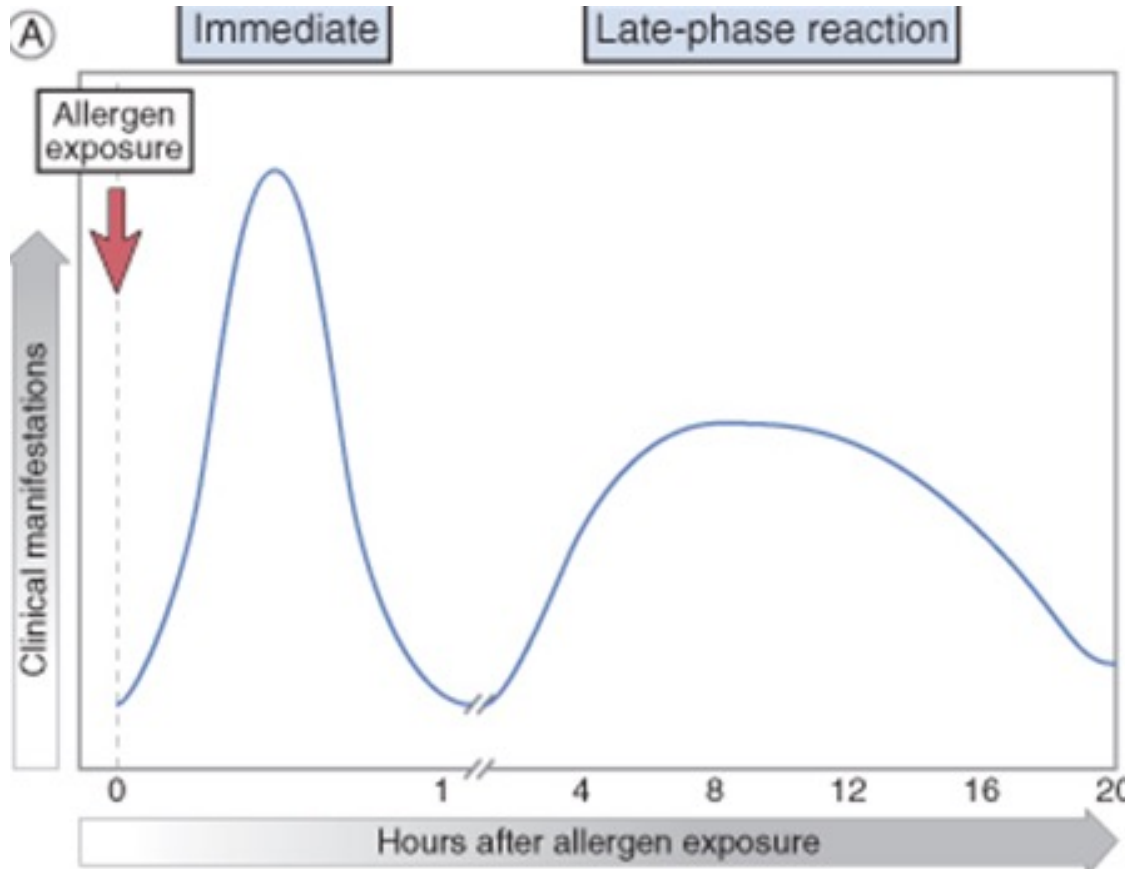
Il mastocita attivato rilascia mediatori che sono responsabili delle manifestazioni cliniche e patologiche delle reazioni di ipersensibilità di tipo I. La reazione di ipersensibilità di tipo I presenta una fase immediata e una fase tardiva.

Aspetto della reazione immediata e della fase tardiva che si sviluppa dopo iniezione intradermica dell'antigene in un soggetto allergico all'acaro della polvere



La reazione tardiva consiste nell'accumulo di leucociti (neutrofili eosinofili linfociti Th2) mediato dal TNF-alfa e da fattori chemiotattici per eosinofili e linfociti T.

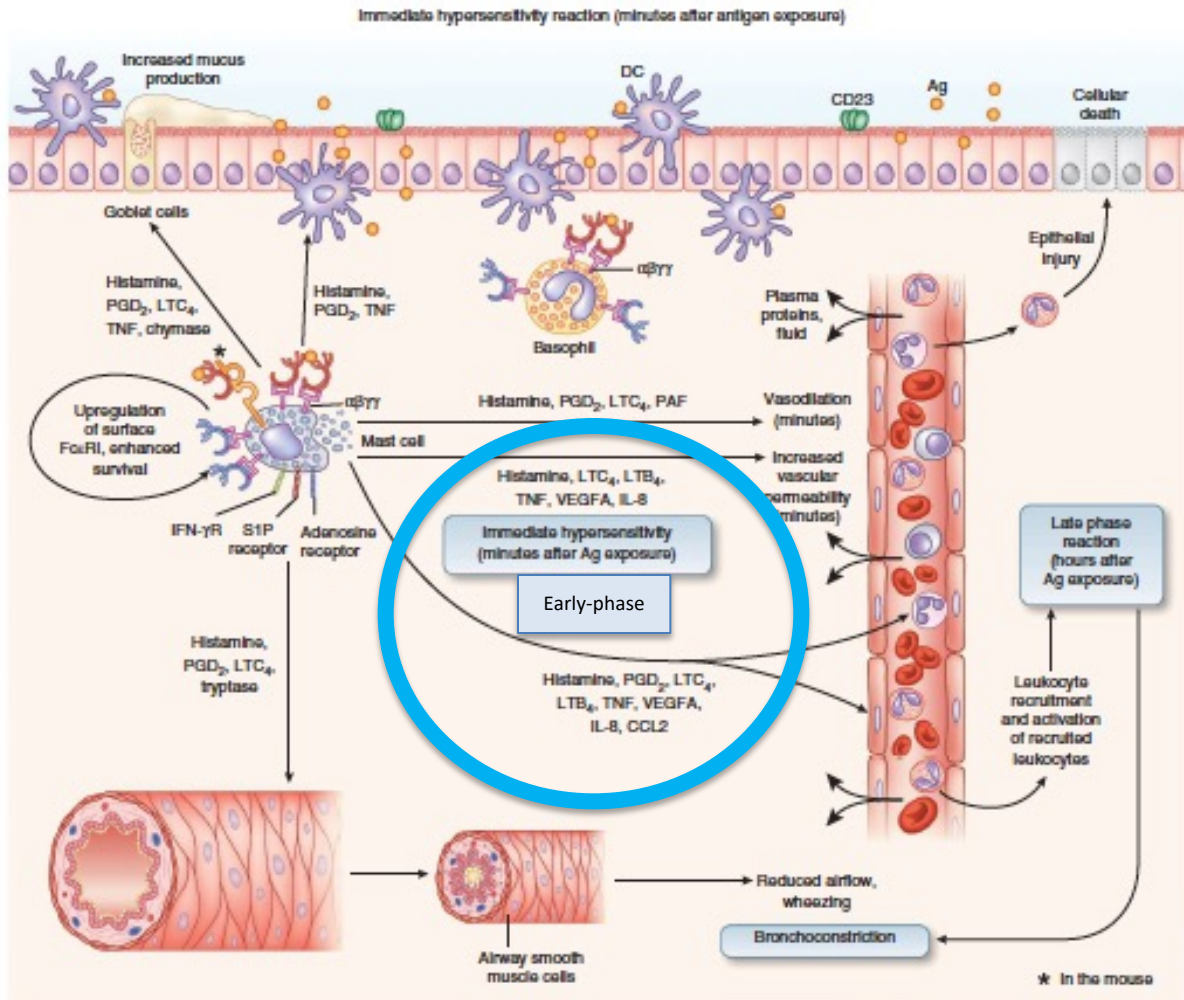
Fase immediata e fase tardiva della reazione di ipersensibilità di tipo I



La fase immediata della reazione di ipersensibilità di tipo I ha luogo pochi minuti dopo l'esposizione all'allergene (5-10 minuti).

La fase tardiva si sviluppa dopo alcune ore dal contatto con l'allergene e può persistere anche per diverse ore

Il secondo incontro con l'allergene determina la reazione di ipersensibilità immediata «early phase»



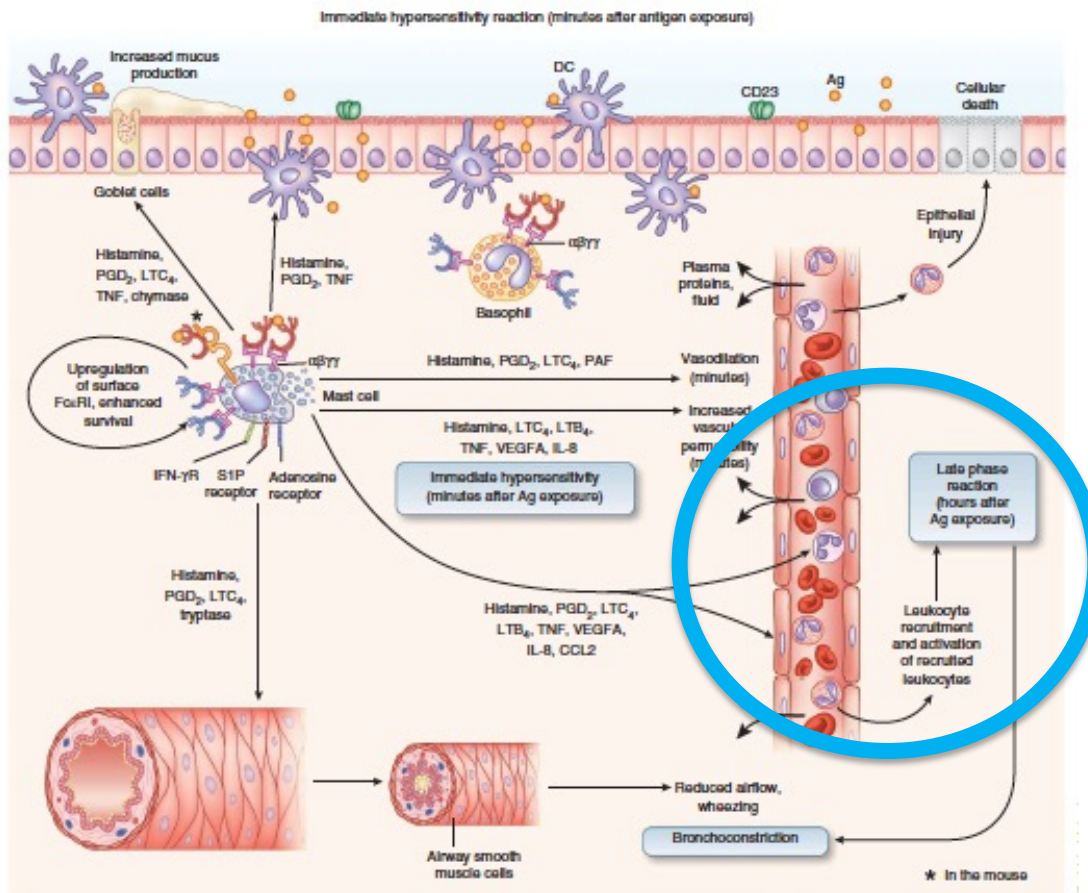
Il secondo contatto con l'allergene determina l'aggregazione degli FcεRI sui mastociti e la loro attivazione. I mastociti attivati rilasciano diversi mediatori biologici.

I mediatori rilasciati immediatamente dopo l'attivazione dei mastociti mediano la **“early phase” fase immediata**

caratterizzata da:

- i) aumento della permeabilità vasale e vasodilatazione
- ii) contrazione della muscolatura bronchiale
- iii) secrezione di muco

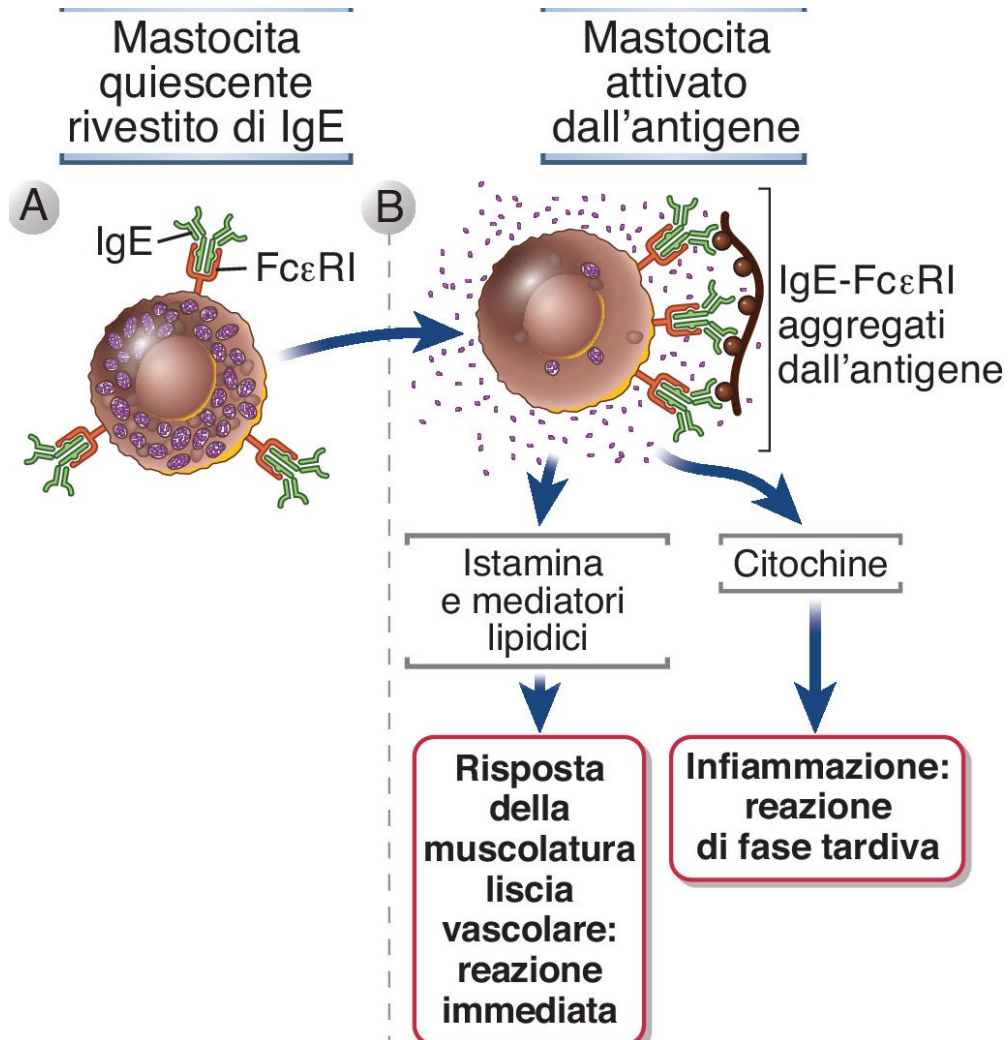
Late phase reaction nelle reazioni di ipersensibilità immediata



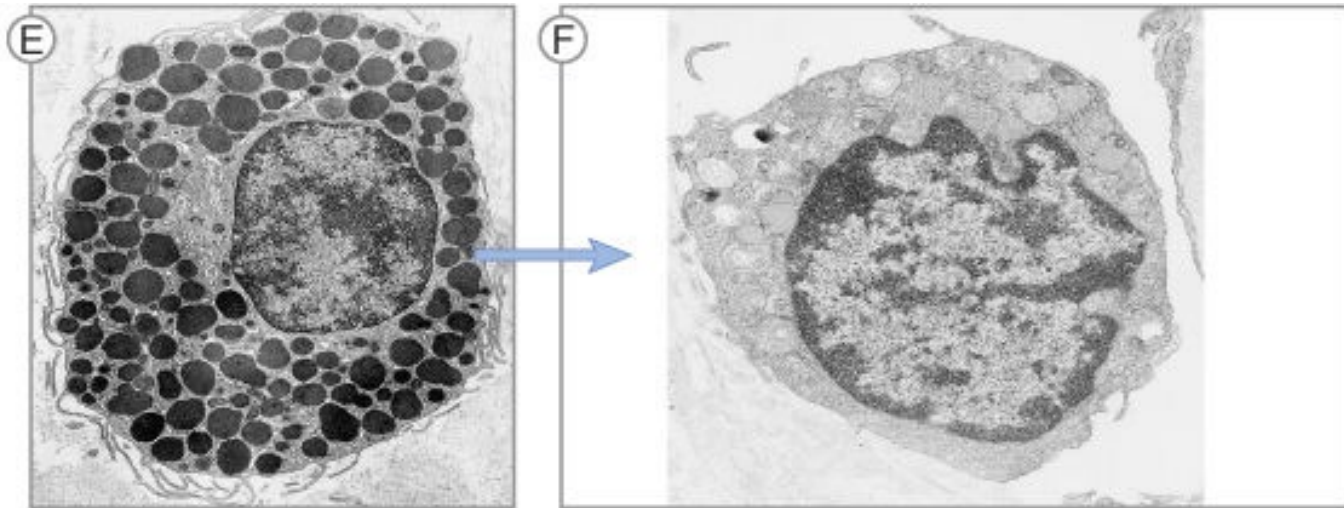
La fase tardiva delle reazioni di ipersensibilità immediata si sviluppa dopo 2-6h dall'incontro con l'allergene e riflette il reclutamento e l'attivazione delle cellule Th2, eosinofili, basofili e altri leucociti nel sito di contatto con l'allergene.

Tale reclutamento è mediato dalle citochine prodotte dai mastociti e dagli altri leucociti reclutati.

I mediatori rilasciati o prodotti dai mastociti attivati dall'allergene mediano la fase precoce e la fase tardiva delle reazioni allergiche



Mediatori prodotti dai mastociti e basofili attivati

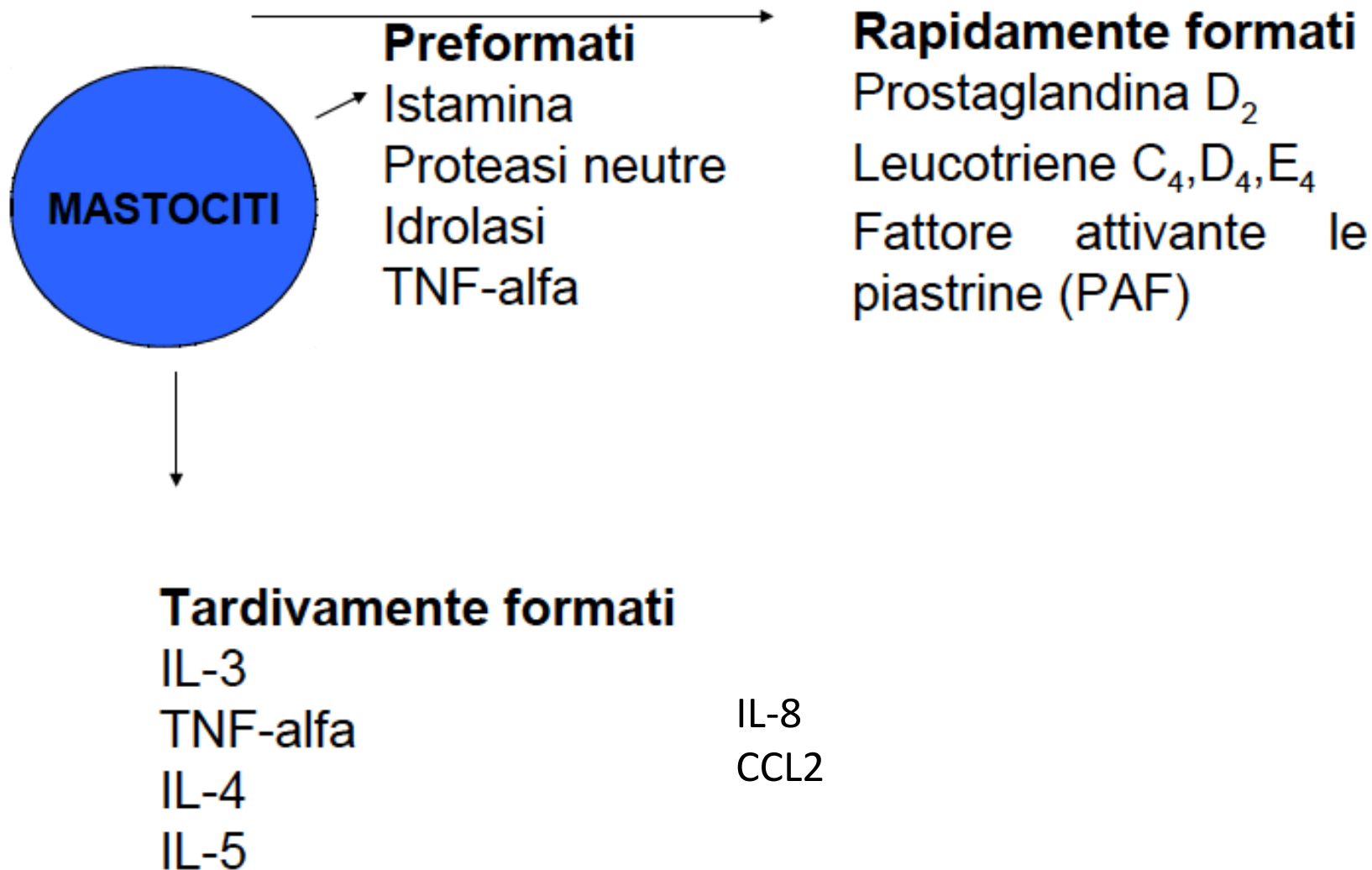


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

- **MEDIATORI PREFORMATI:** ISTAMINA, TNF- α
- **MEDIATORI DI NUOVA SINTESI:** METABOLITI DELL'ACIDO ARACHIDONICO (prostaglandine e leucotrieni)

CITOCHINE

MEDIATORI PRODOTTI DAI MASTOCITI



L'istamina

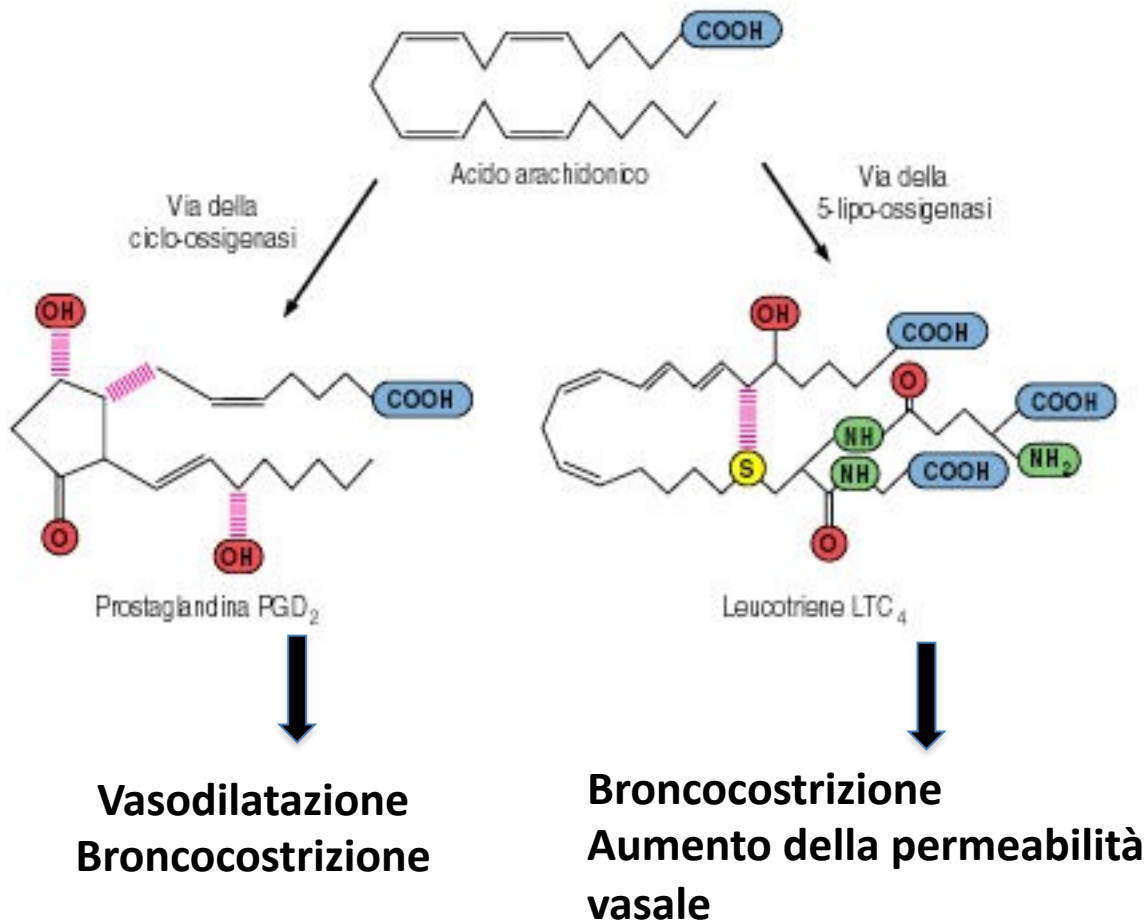


L'istamina deriva dalla decarbossilazione dell'istidina, agisce legandosi a recettori espressi sulle cellule bersaglio (H1, H2, H3, H4) media:

1) Contrazione delle **cellule endoteliali (aumento della permeabilità vasale)** e stimola nelle cellule endoteliali la produzione di Prostaciclina=PGI₂ e ossido nitrico che agiscono rilassando la muscolatura liscia dei vasi causando **vasodilatazione**.

2) **Contrazione della muscolatura liscia bronchiale e intestinale.**

Mediatori Lipidici: Leucotrieni e prostaglandine



I principali metaboliti dell'acido arachidonico prodotti dai mastociti attivati sono: la prostaglandina D_2 e i leucotrieni LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 .

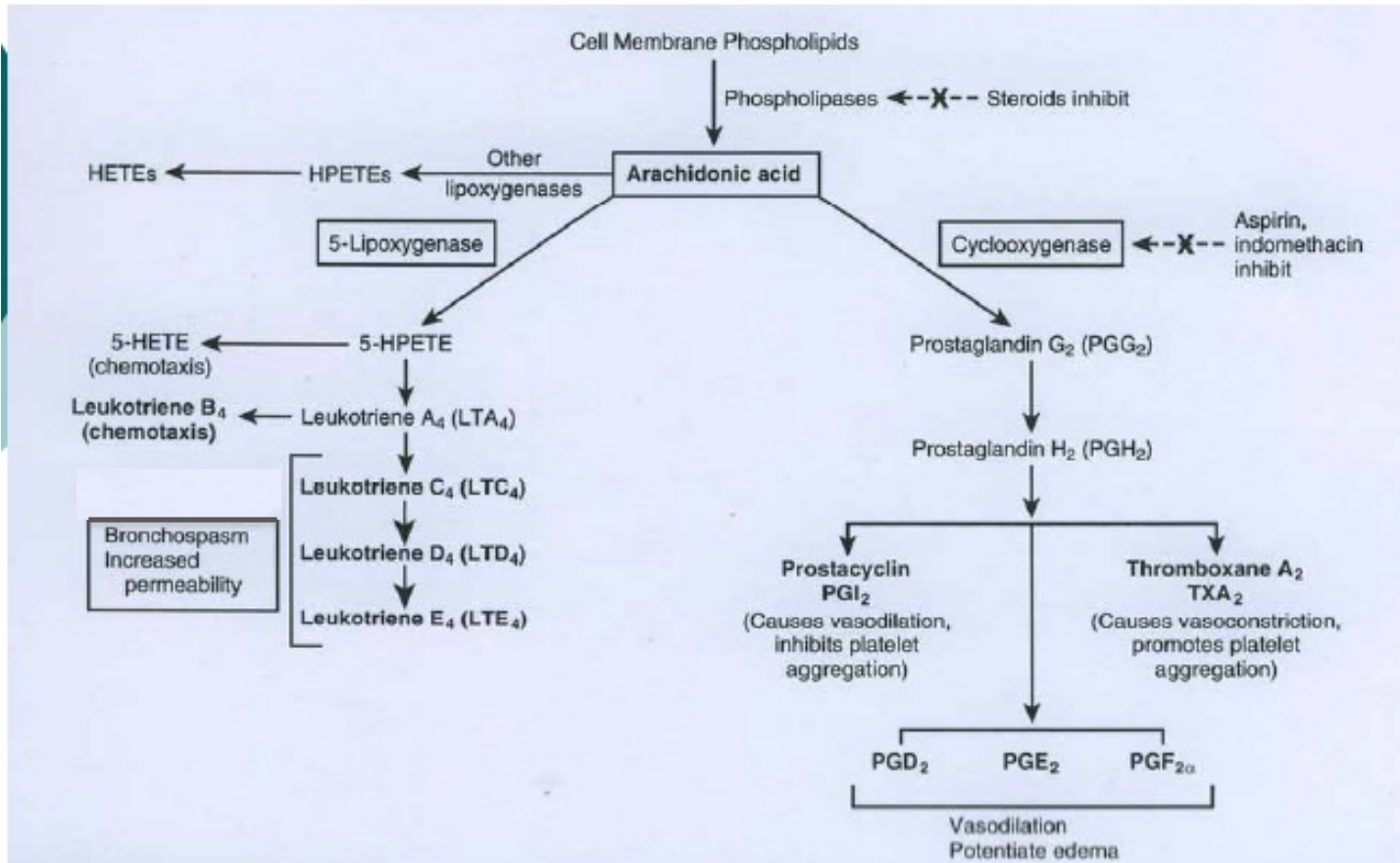
La Prostaglandina D_2 (PGD_2) generata attraverso la via della ciclossigenasi si lega a specifici recettori espressi sulle cellule muscolari lisce inducendo vasodilatazione e broncocostrizione

- Leucotriene C_4 generato attraverso la via della lipo-ossigenasi

= prolungata broncocostrizione e aumento della permeabilità vasale.

I leucotrieni C_4 e D_4 hanno una azione broncocostrittrice 1000 volte superiore a quella dell'istamina

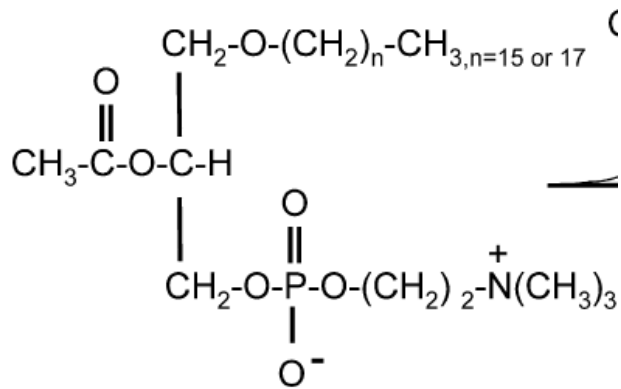
Generazione dei metaboliti dell'acido arachidonico



5-HPETE acido 5-idrossieicosatetraenoico

L'attivazione della fosfolipasi A2 nei mastociti attivati libera l'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana. La via della ciclossigenasi mediata dai due enzimi COX-1 e COX-2 porta alla produzione delle **prostaglandine**. Nella via della lipossigenasi l'acido arachidonico viene trasformato in LTA₄. LTA₄ viene rapidamente trasformato in **LTB₄** e **LTC₄**.

Platelet activating factor



PAF

Il PAF viene sintetizzato a partire dalla lisogliceril-etere fosforilcolina derivata dall'idrolisi dei fosfolipidi di membrana ad opera della fosfolipasi A2.

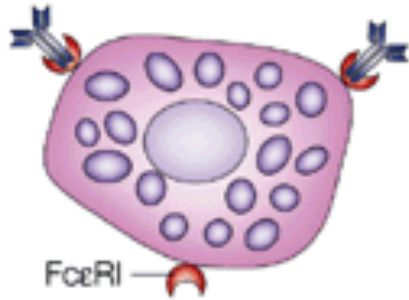
Il PAF ha una azione broncocostrittrice diretta, rilassa la muscolatura liscia vascolare causando vasodilatazione.

Citochine prodotte dai mastociti attivati

Le citochine prodotte da mastociti e basofili attivati dall'allergene sono prodotte più tardivamente e contribuiscono al processo infiammatorio allergico tardivo (late phase) mediando :

- i) il reclutamento di leucociti infiammatori quali eosinofili, basofili, neutrofili e cellule T CD4+
- ii) l'attivazione dell'endotelio e delle cellule immuni

Citochine prodotte dai mastociti attivati



I mastociti attivati producono: TNF- α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, CCL2, CCL3 e il GMCSF.

TNF- α attraverso l'up-regolazione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali e le chemochine IL-8 e CCL2 favoriscono il reclutamento dei leucociti.

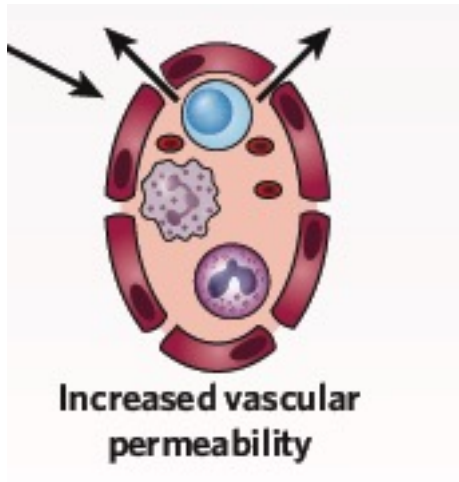
IL-3 favorisce la generazione di mastociti a partire dai progenitori midollari CD133+.

IL-5 coinvolta nella maturazione, reclutamento, attivazione degli eosinofili.

IL-13 induce la secrezione di muco

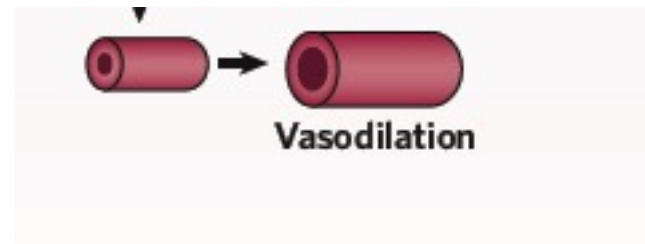
IL-4 favorisce il reclutamento dei leucociti dal circolo sanguigno upregolando le molecole di adesione sulle cellule endoteliali.

Mediatori responsabili delle modificazioni vascolari nelle reazioni di ipersensibilità di tipo I

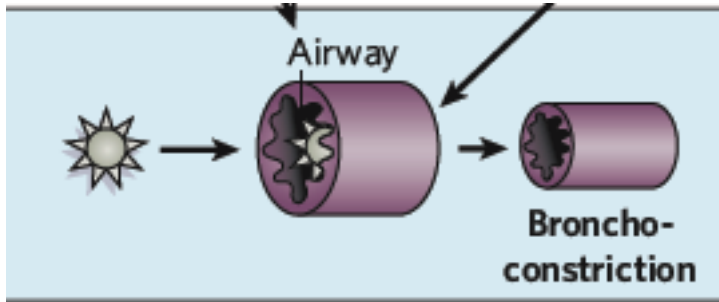


Aumento della permeabilità vasale: Istamina, LTC₄, LTD₄, LTE₄ (cys-LTs).

Vasodilatazione: Istamina, PGD₂, PAF



Mediatori responsabili della broncocostrizione e della contrazione della muscolatura liscia intestinale nelle reazioni di ipersensibilità di tipo I

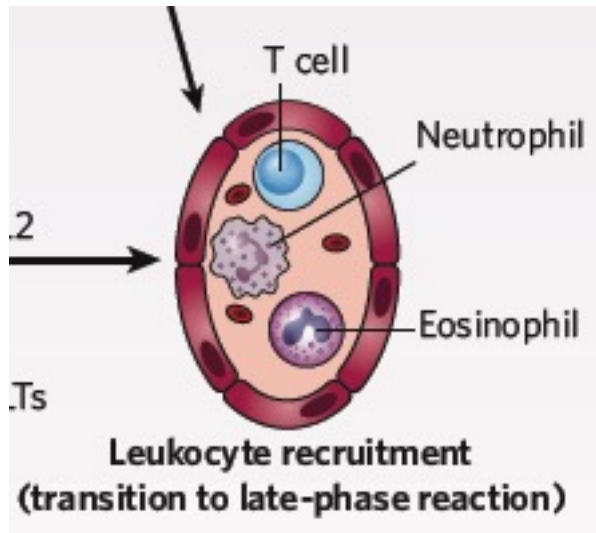


Istamina, PGD_2 , LTC_4 .



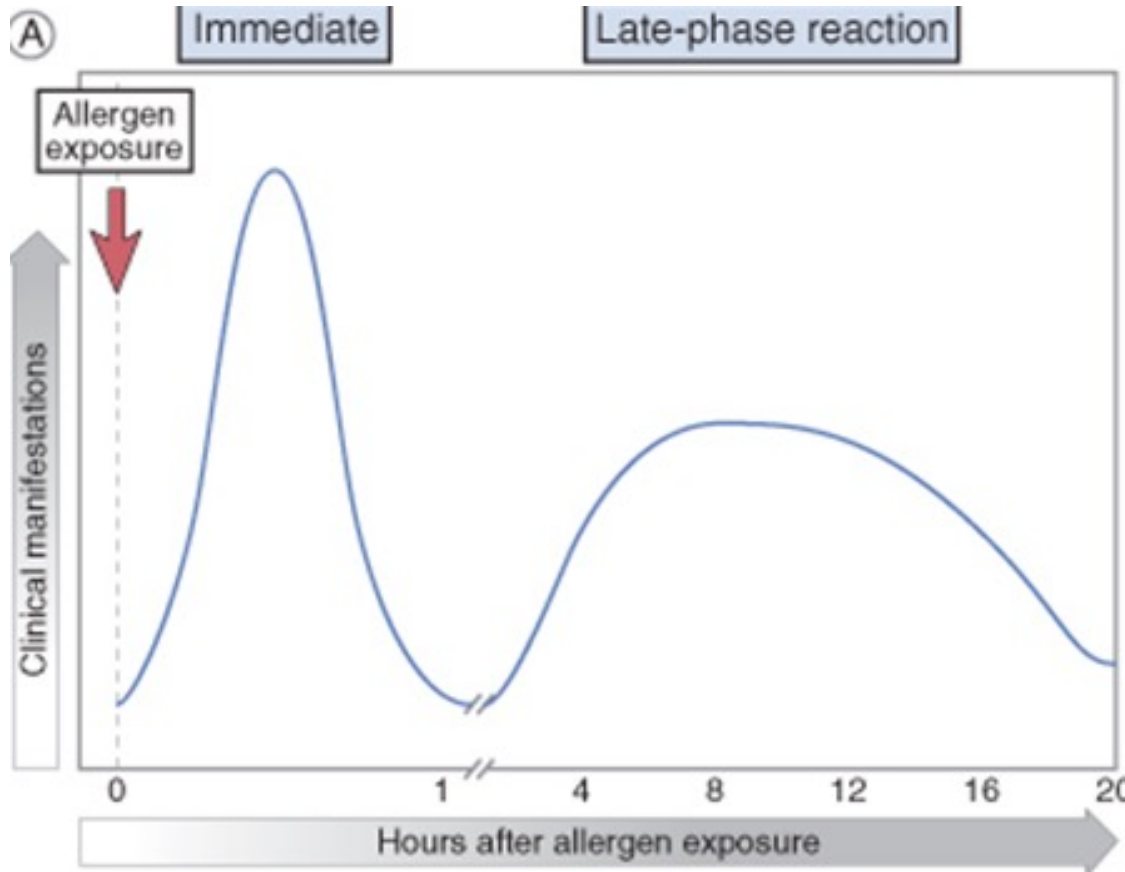
**Aumento
della peristalsi
intestinale**

Mediatori responsabili del reclutamento dei leucociti e della loro attivazione nelle reazioni di ipersensibilità di classe I



L'infiammazione allergica caratterizzata dal reclutamento di linfociti Th2, eosinofili e neutrofili è mediata da diverse citochine prodotte dai mastociti: $\text{TNF-}\alpha$, IL-8, CCL2, IL-5

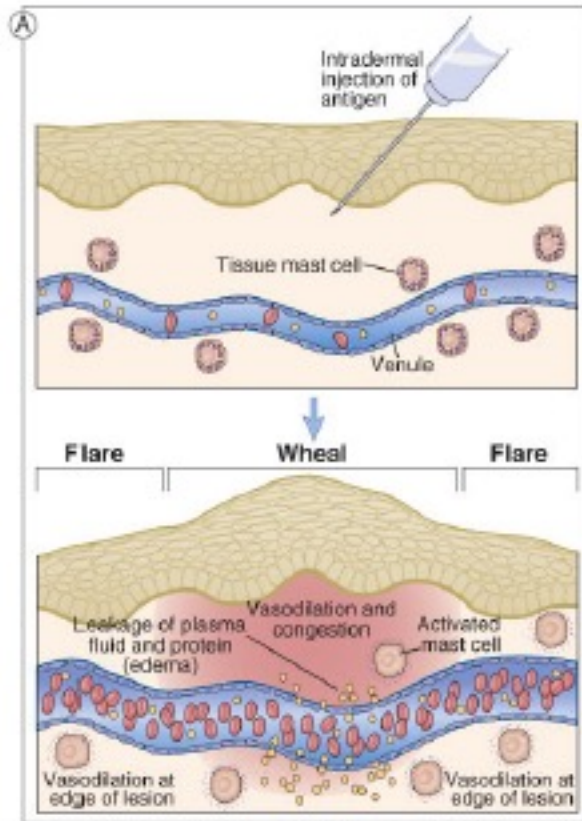
Fase immediata e fase tardiva della reazione di ipersensibilità di tipo I



La fase immediata della reazione di ipersensibilità di tipo I ha luogo pochi minuti dopo l'esposizione all'allergene. Questa fase è dovuta all'azione dei mediatori preformati e dei metaboliti dell'acido arachidonico rilasciati dai mastociti attivati. Questi sono responsabili dei sintomi della fase immediata.

La fase tardiva si sviluppa dopo alcune ore dal contatto con l'allergene ed è mediata dalle citochine, chemochine e fattori di crescita che sono sintetizzati e rilasciati più tardivamente dai mastociti attivati e che mediano il reclutamento dei linfociti Th2, degli eosinofili, e dei neutrofili.

Reazione allergica localizzata



Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Figure 19-8 The wheal and flare reaction in the skin.

La reazione ponfo-eritematosa è la reazione caratteristica innescata dall'inoculo dell'allergene per via intradermica.

- 1) Arrossamento del sito di inoculo (dilatazione dei capillari e rallentamento del flusso)
- 2) Rigonfiamento (fuoriuscita di fluidi e proteine del plasma)

La reazione ponfo eritematosa si manifesta nel giro di 5-10 minuti dall'inoculo dell'allergene.

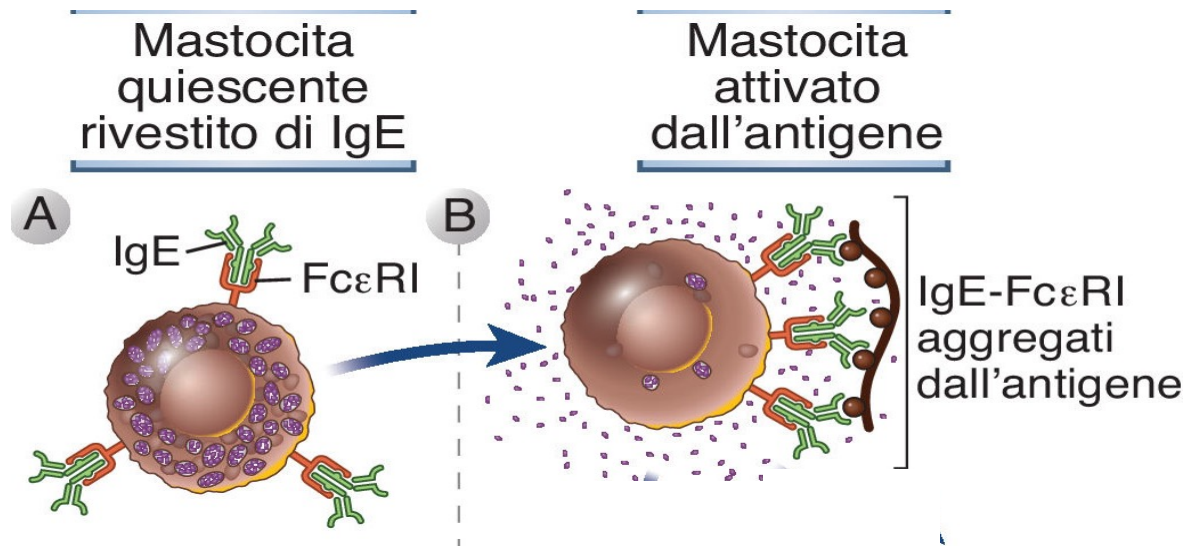
Dopo 2-4 ore fa seguito una reazione infiammatoria tardiva caratterizzata dall'accumulo di neutrofili, eosinofili, linfociti T CD4+

Prick test

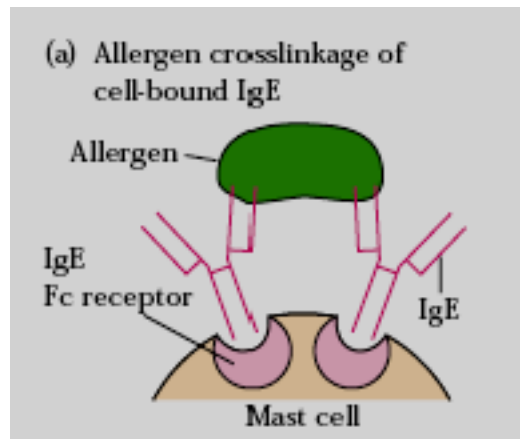


Il prick test è un esame allergometrico che consente di formulare una diagnosi di allergia. Sono **test cutanei** per verificare la **reazione allergica** a diversi tipi di **sostanze**: alimenti, veleno di insetti, lattice, polvere e acari, polline, peli di animali. Al paziente vengono applicate modeste quantità dell'allergene della sostanza sospettata di provocare la reazione. L'applicazione avviene solitamente sull'avambraccio interno, favorendone la penetrazione nella pelle con graffi leggeri. Se in corrispondenza dell'applicazione si verifica un'eruzione cutanea, sotto forma di rash, pomfi o chiazze rosse, il paziente è molto probabilmente positivo a quel tipo di allergene e può essere formulata una diagnosi.

Nelle reazioni allergiche l'attivazione dei mastociti è dovuta alla aggregazione dei recettori $Fc\epsilon RI$ in seguito alla interazione fra allergene-IgE



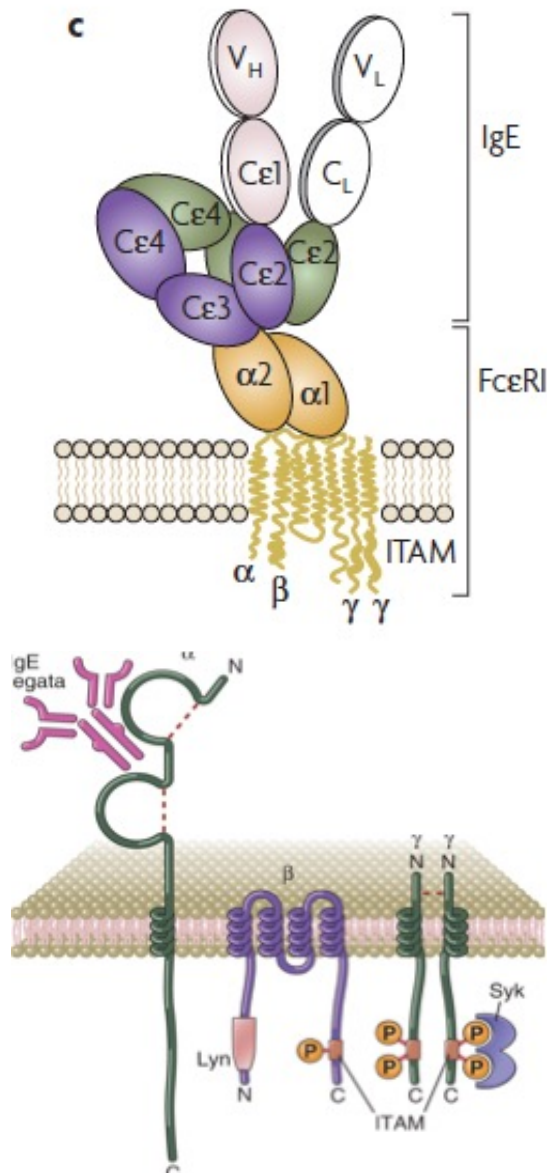
In che modo l'allergene interagendo con le IgE legate al mastocita determina l'attivazione del mastocita?



La degranulazione dei mastociti mediata dalle IgE ha inizio quando un allergene lega 2 o più IgE (crosslinking).

Allergeni monovalenti non sono in grado di indurre degranulazione

Recettore ad alta affinità per le IgE: FcεRI



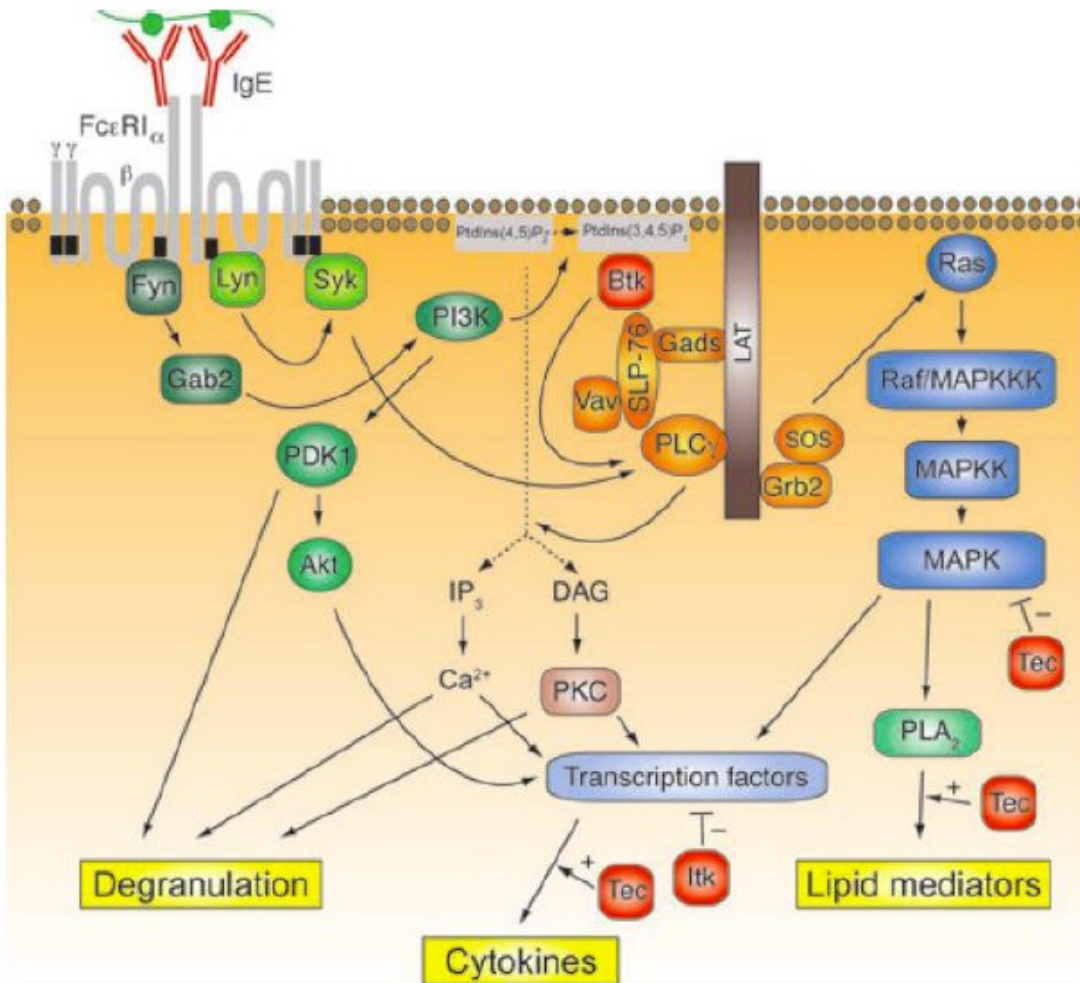
I mastociti e i basofili esprimono il recettore ad alta affinità per le IgE che è composto da tre subunità polipetidiche: catena α , catena β e l'omodimero $\gamma\gamma$.

Catena α = appartenente alla superfamiglia delle Ig presenta due domini Ig like nella porzione extracellulare e lega con alta affinità i domini CH3 e CH4 delle IgE.

Catena β = attraversa la membrana 4 volte contiene un motivo ITAM.

Dimero $\gamma\gamma$ si estende nella regione intracitoplasmatica e presenta sequenze ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif: YXXL/I(x)₆₋₈YXXL/I).

Attivazione dei mastociti: eventi biochimici



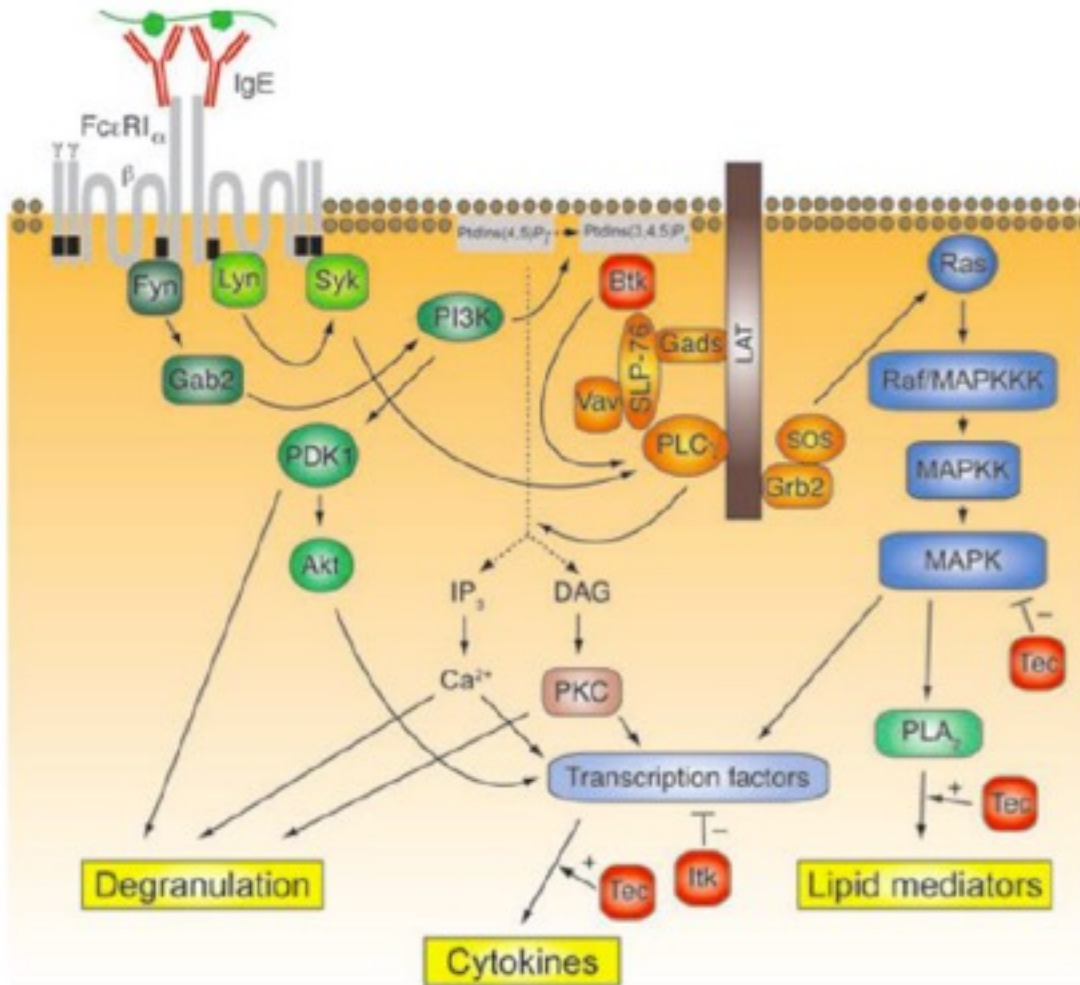
L'aggregazione degli FcεRI in seguito al legame fra l'antigene e le IgE determina l'attivazione dei mastociti con conseguente:

- i) secrezione dei granuli,
- ii) produzione dei mediatori lipidici,
- iii) sintesi di citochine.

L'aggregazione degli FCεR permette:

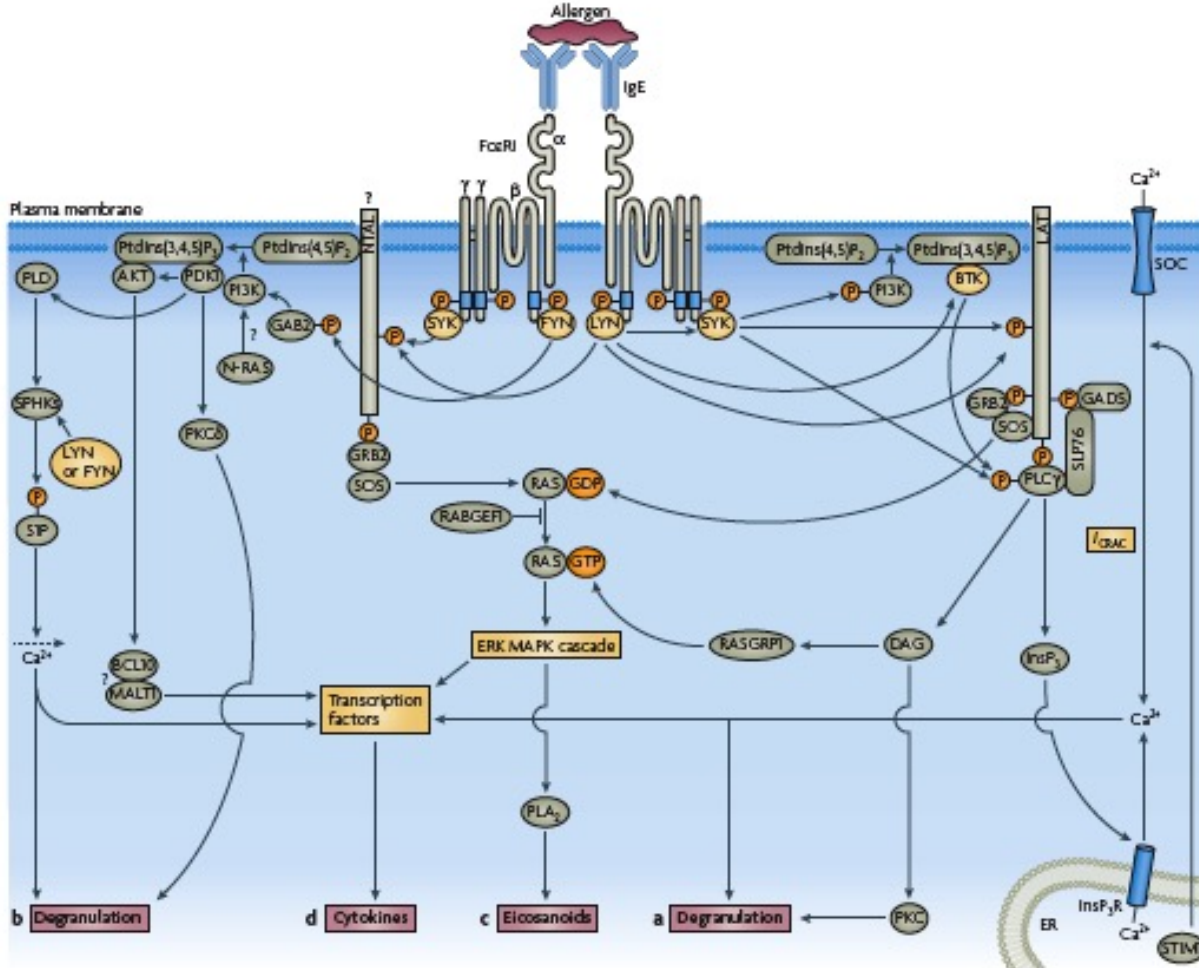
- i) la fosforilazione delle sequenze ITAM delle catene β e γ del recettore
- ii) l'attivazione a valle delle tirosin chinasi che fosforilano proteine adattatrici che coordinano l'attivazione di distinte vie di segnalazione.

Eventi precoci nella trasduzione dell'FcεRI



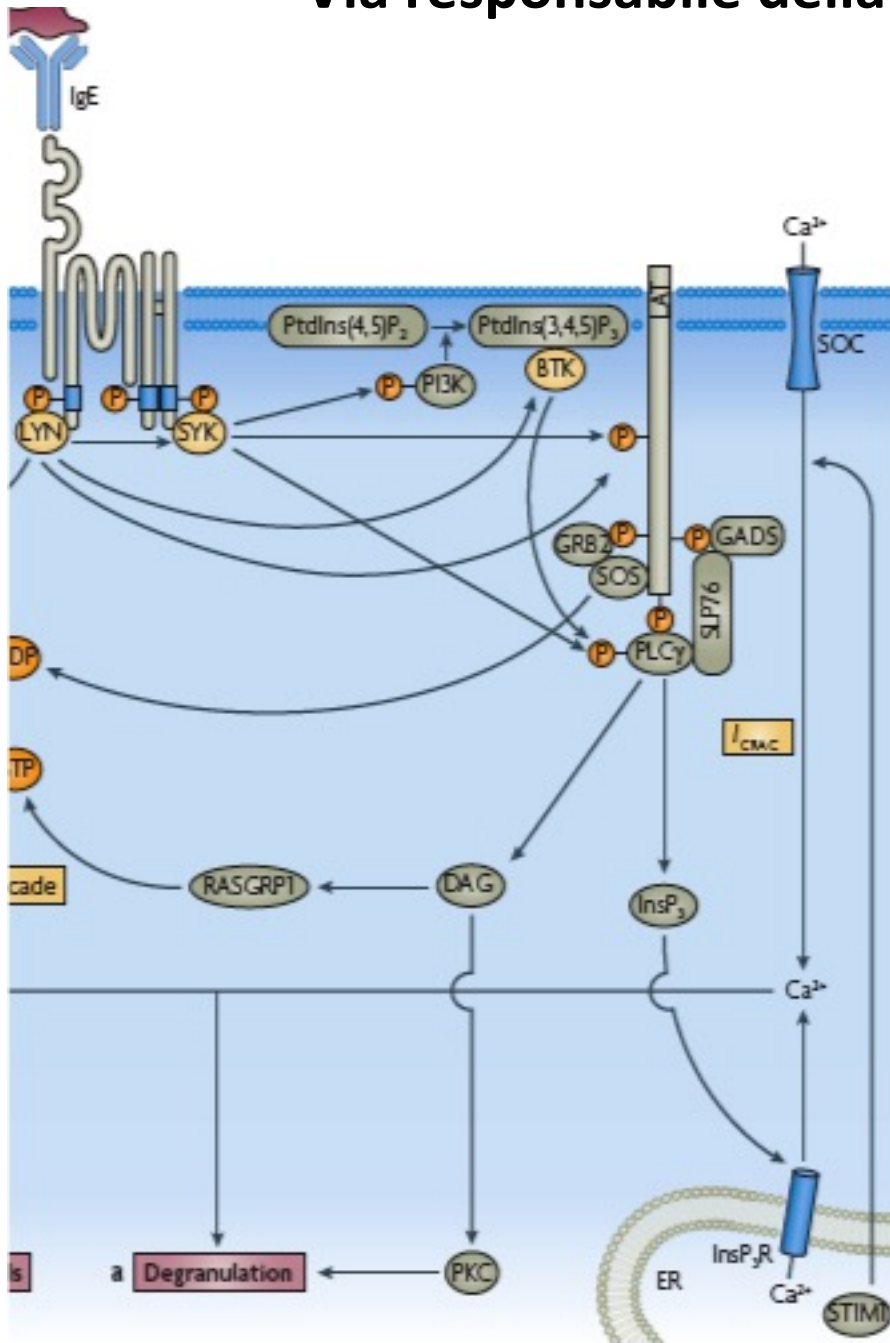
Gli eventi precoci indotti dalla aggregazione degli FcεRI includono la fosforilazione delle sequenze ITAM presenti sulle catene beta e gamma del recettore da parte della src chinasi lyn. La fosforilazione delle ITAM media il reclutamento della tirosin chinasi SYK sulle sequenze ITAM delle catene gamma.

Attivazione delle vie responsabili della degranulazione e della sintesi dei mediatori lipidici



SYK attivata fosforila la molecola adattatrice LAT (Linker for the activation of T cells) che in questo modo è in grado di legare diverse proteine di segnalazione quali la fosfolipasi C_γ (PLC_γ) e la molecola adattatrice Grb2 permettendo l'attivazione della PLC_γ e della via di Ras responsabili della degranulazione e dell'attivazione della fosfolipasi A₂ (responsabile dell'idrolisi dei fosfolipidi di membrana e della liberazione di acido arachidonico da cui sono sintetizzati prostaglandine e leucotrieni) rispettivamente.

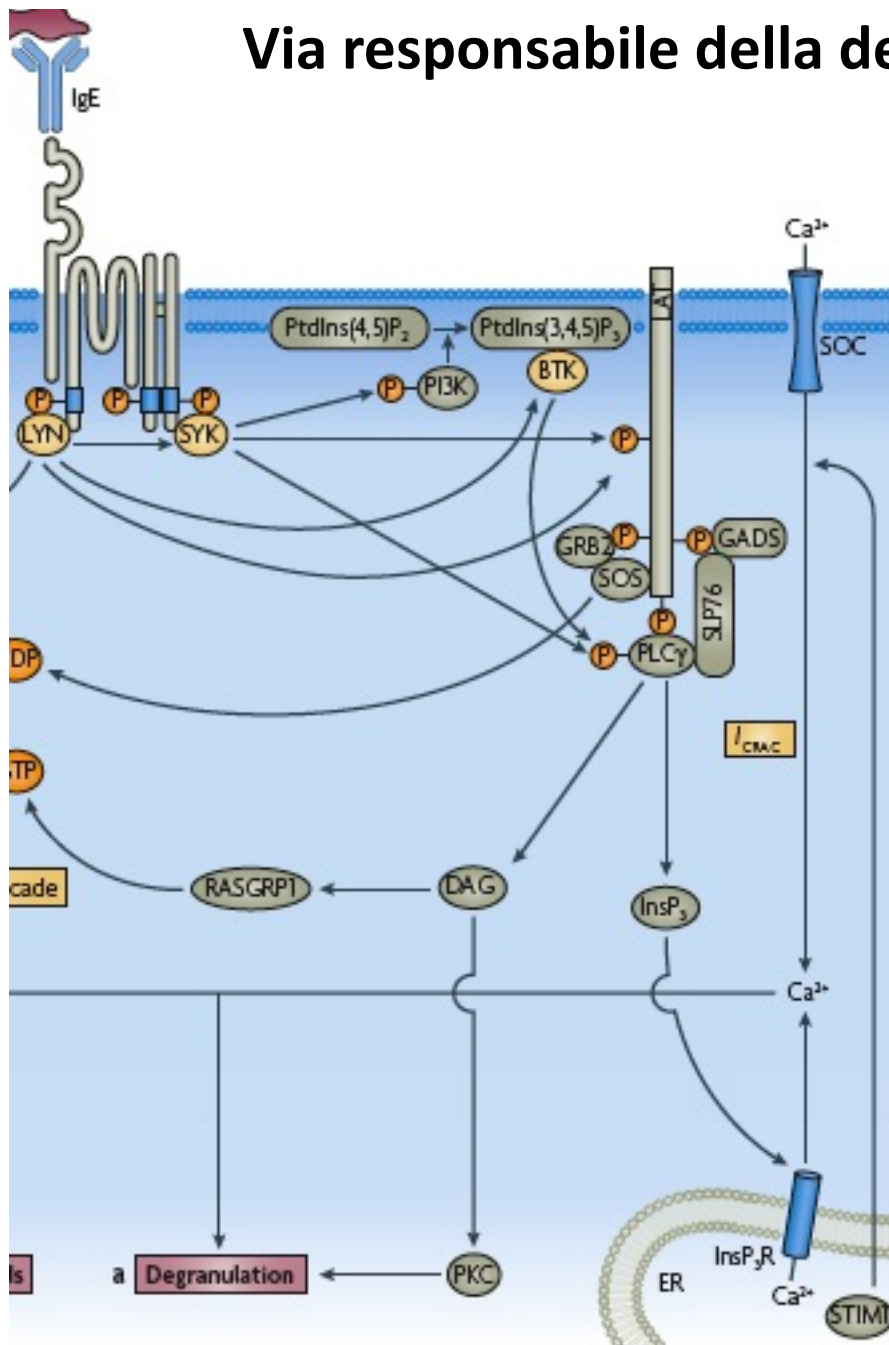
Via responsabile della degranulazione



Il reclutamento su LAT fosforilata di GADS, SLP76 e PLCγ determina l'attivazione di quest'ultima. PLCγ fosforilata scinde il fosfatidil inositolo bifosfato in IP₃ e DAG.

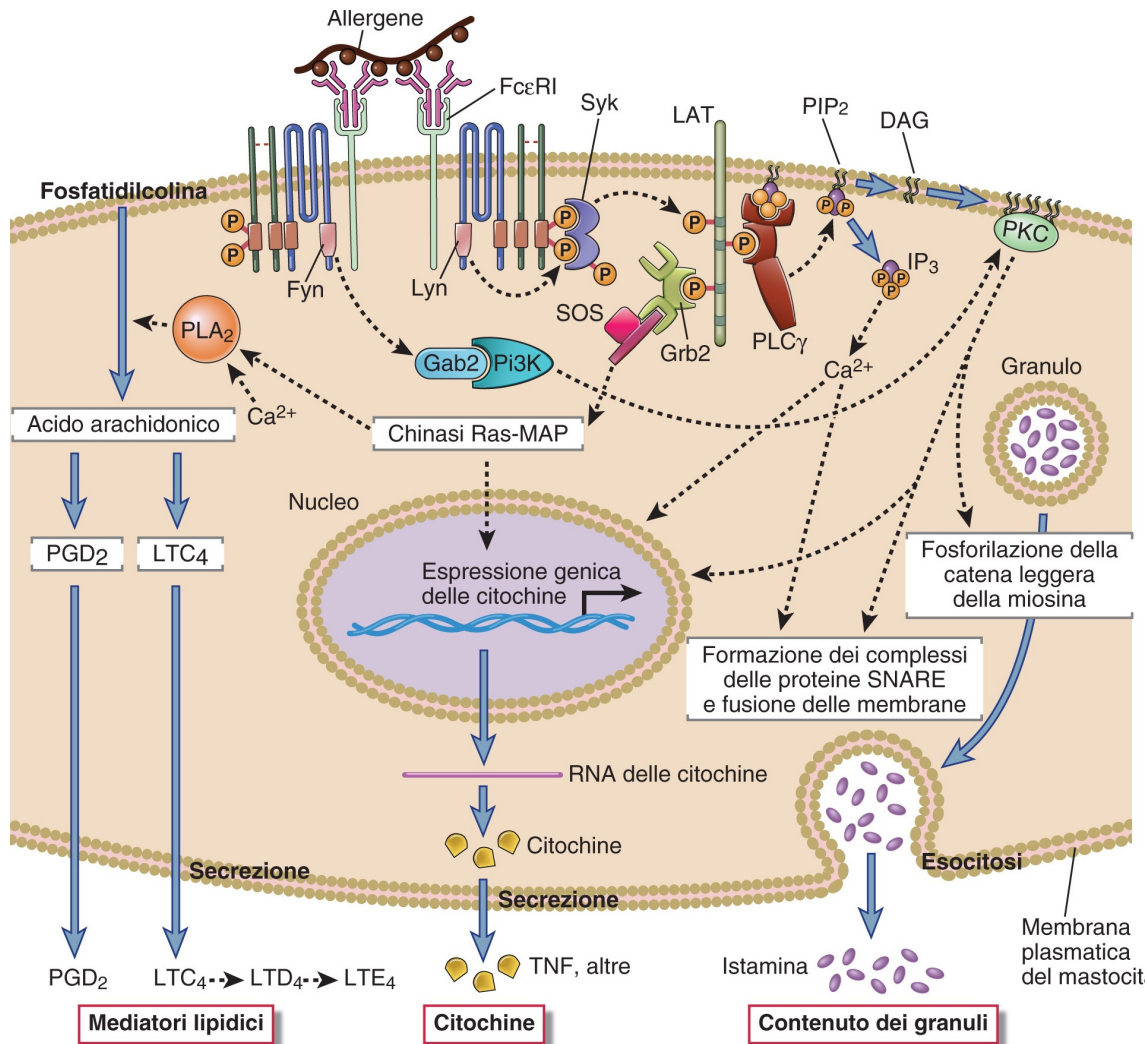
L'IP₃ media il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico, aumentando i livelli di Ca²⁺ intracellulare mentre il DAG attiva la PKC. La fosforilazione delle catene della miosina da parte della PKC porta al disassemblaggio dei complessi actina miosina presenti sotto la membrana plasmatica permettendo ai granuli di entrare in contatto con la membrana plasmatica.

Via responsabile della degranulazione



La deplezione di Ca⁺⁺ dai compartimenti cellulari determina un influsso di Ca⁺⁺ extracellulare. La deplezione di Ca⁺⁺ è rilevata dalle proteine STIM (stromal interaction molecule 1) le quali attivano i canali ionici di membrana denominati SOC.

Degranulazione



La fusione delle membrane dei granuli con la membrana plasmatica è mediata dall'interazione fra proteine SNARE. La formazione dei complessi fra proteine SNARE è regolata da diverse proteine accessorie. L'aumento dei livelli di calcio e l'attivazione della PKC mediano la fusione dei granuli con la membrana plasmatica.

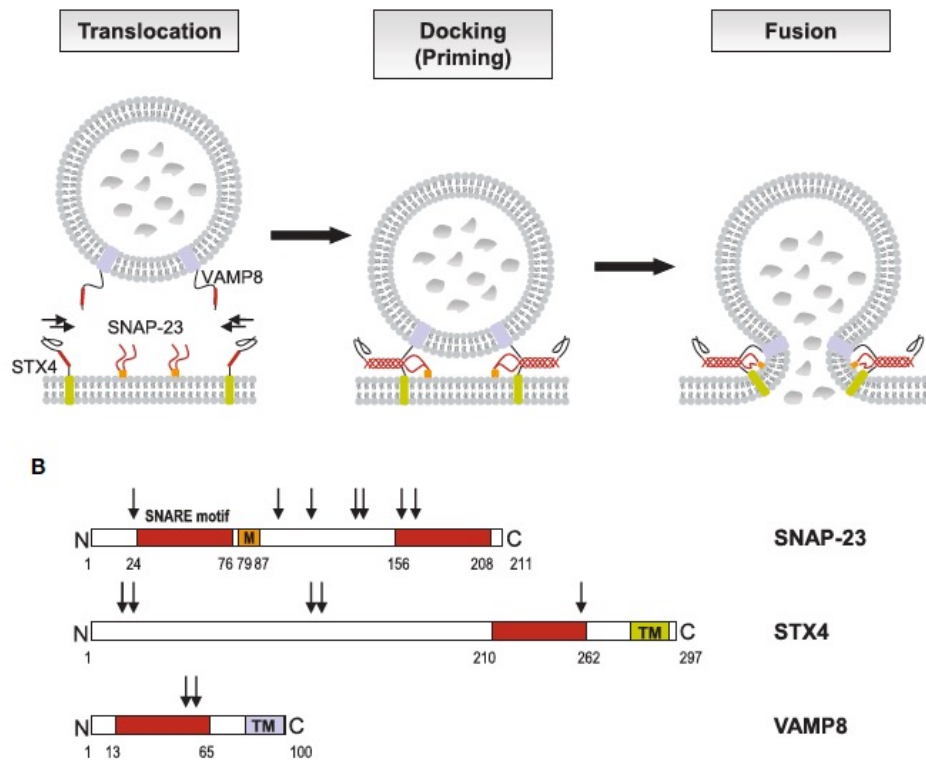


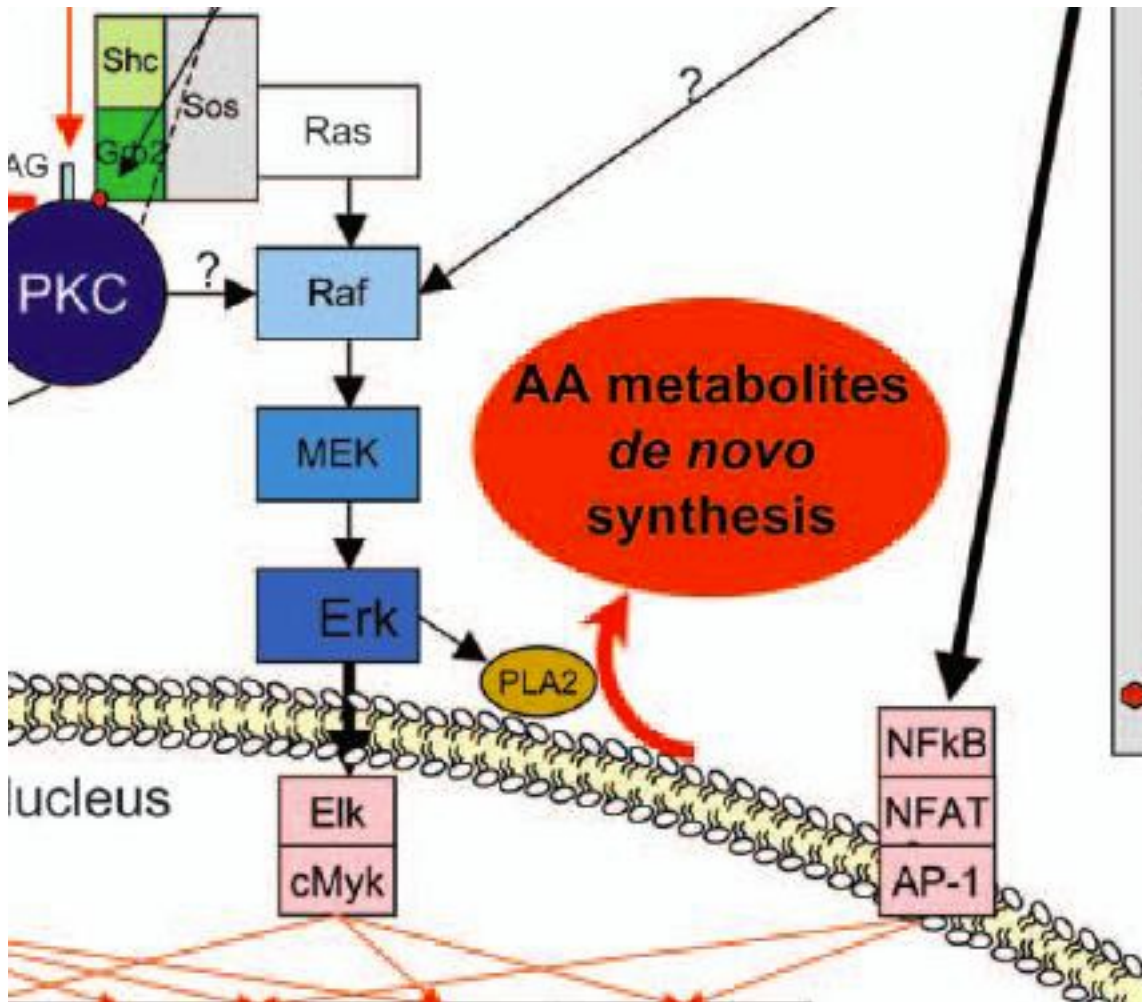
FIGURE 2 | SNARE catalyzed granule fusion in mast cells.

(A) Secretion of mediators requires fusion of vesicle and plasma membranes. Upon activation through FcεRI secretory granules translocate to and dock at the plasma membrane where the t-SNAREs SNAP-23 and STX4 together with the v-SNARE VAMP8 form stable tetrameric complexes of bundled helices bringing the lipid bilayers into a close distance to catalyze membrane fusion. The SNARE motifs of SNAP-23, STX4, and VAMP8, which become highly organized in the four helical bundle during the formation of the trans-SNARE complex are highlighted in color. **(B)** The primary structure of human SNAP-23, STX4,

and VAMP8 as adapted from Hong (2005) is shown with SNARE motifs for each protein in like colors. STX4 and VAMP8 have C-terminal transmembrane domains (TM), whereas the linker domain of SNAP-23, which connects the two SNARE motifs, has a membrane anchor domain, consisting of palmitoylated cysteine residues (M). Numbers indicate protein or domain boundaries, arrows indicate potential phosphorylation sites (<http://www.phosphosite.org>). Phosphorylation of mouse SNAP-23 on Ser⁹⁵ and Ser¹²⁰ was found to modulate regulated mast cell exocytosis (Hepp et al., 2005), whereas phosphorylation of STX4 was not altered during secretion in RBL cells (Pombo et al., 2001).

Via responsabile della sintesi dei mediatori lipidici

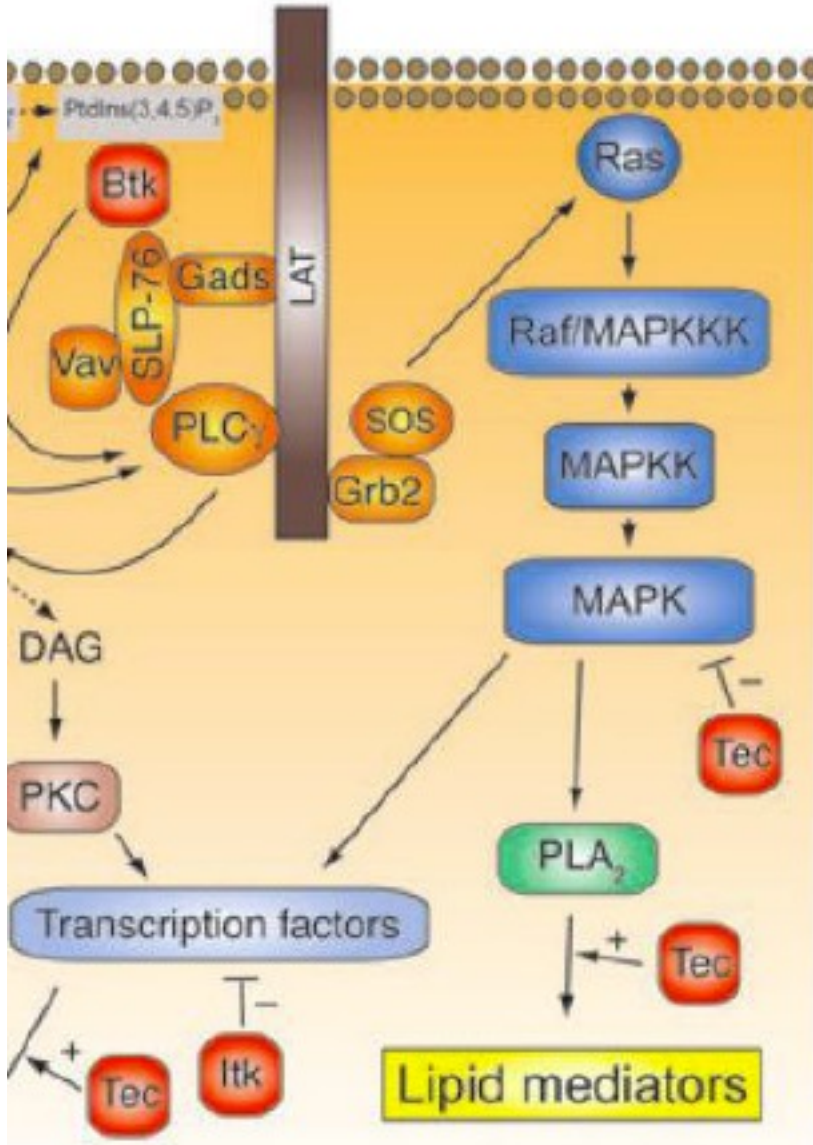
La sintesi dei mediatori lipidici è controllata dall'attivazione della fosfolipasi A2 citoplasmatica



L'attivazione della fosfolipasi A2 richiede la fosforilazione dell'enzima da parte della MAP chinasi Erk e l'aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio.

La PLA2 scinde i lipidi di membrana liberando acido arachidonico.

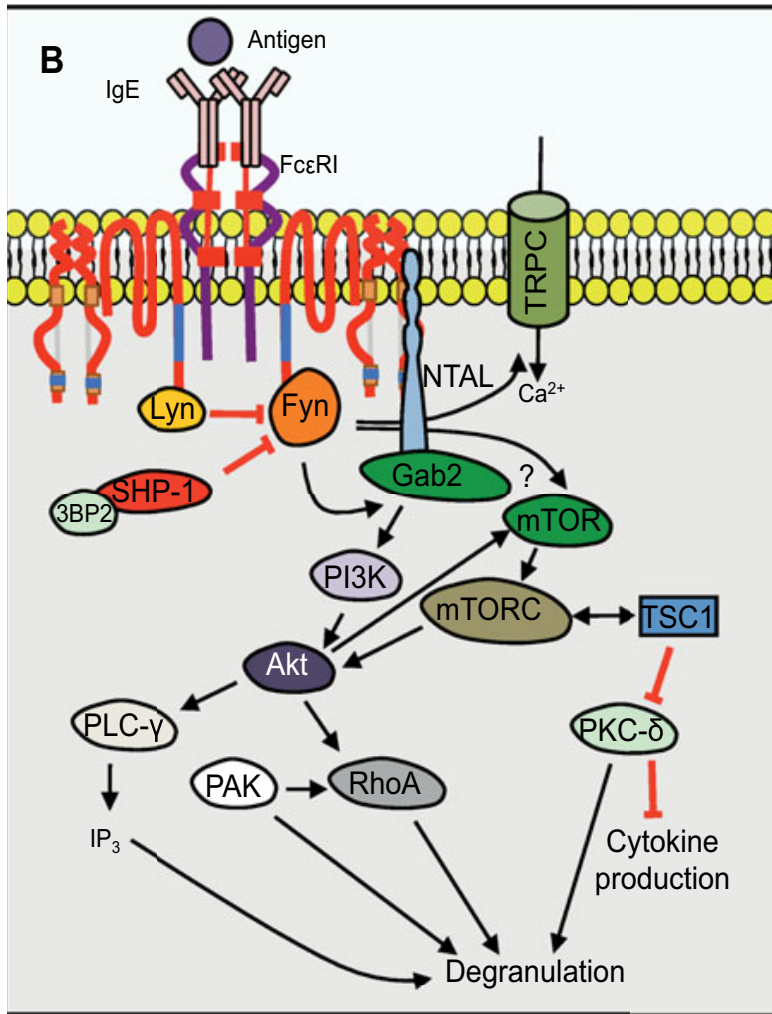
Via responsabile della sintesi dei mediatori lipidici



Il meccanismo di attivazione di Ras coinvolge le proteine adattatrici LAT e Grb2. Una volta associata LAT, Grb2 recluta uno scambiatore GTP/GDP (SOS) generando la forma attiva di Ras. Ras attiva la famiglia di enzimi MAP chinasi.

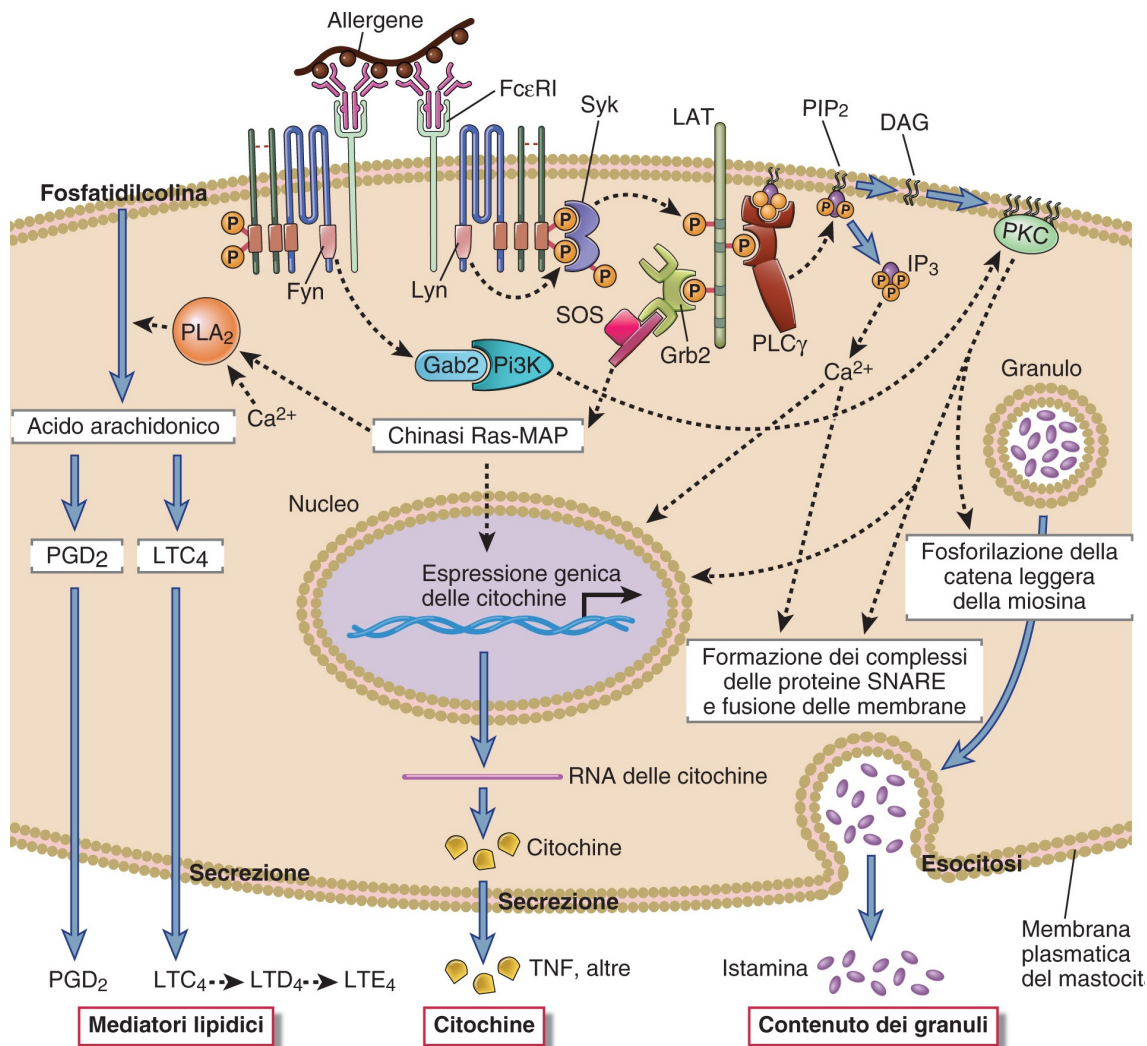
La cascata di chinasi attivata da Ras determina l'attivazione di Erk che fosforila PLA₂.

Via complementare responsabile della degranulazione



Un secondo pathway coinvolto nella degranulazione dei mastociti è mediato dalla chinasi Fyn e dalla proteina GAB2. In seguito all'aggregazione dei recettori FcεRI, la attivazione di Fyn attiva la PI3K attraverso la formazione di un complesso multiproteico costituito anche da GAB2. La PI3K è cruciale nella propagazione della cascata di Fyn attraverso l'attivazione di Akt, la produzione di PIP3 (fosfatidil inositolo trifosfato) con conseguente reclutamento di diverse proteine alla membrana necessarie per attivare la PLCγ.

Induzione della trascrizione delle citochine nei mastociti attivati



In risposta all'aggregazione dell'FcεRI si ha la traslocazione nucleare di fattori trascrizionali quali NF-κB, N-FAT, AP-1. Tali fattori sono responsabili della trascrizione di diverse citochine quali l'IL-4, IL-5, TNF-α.