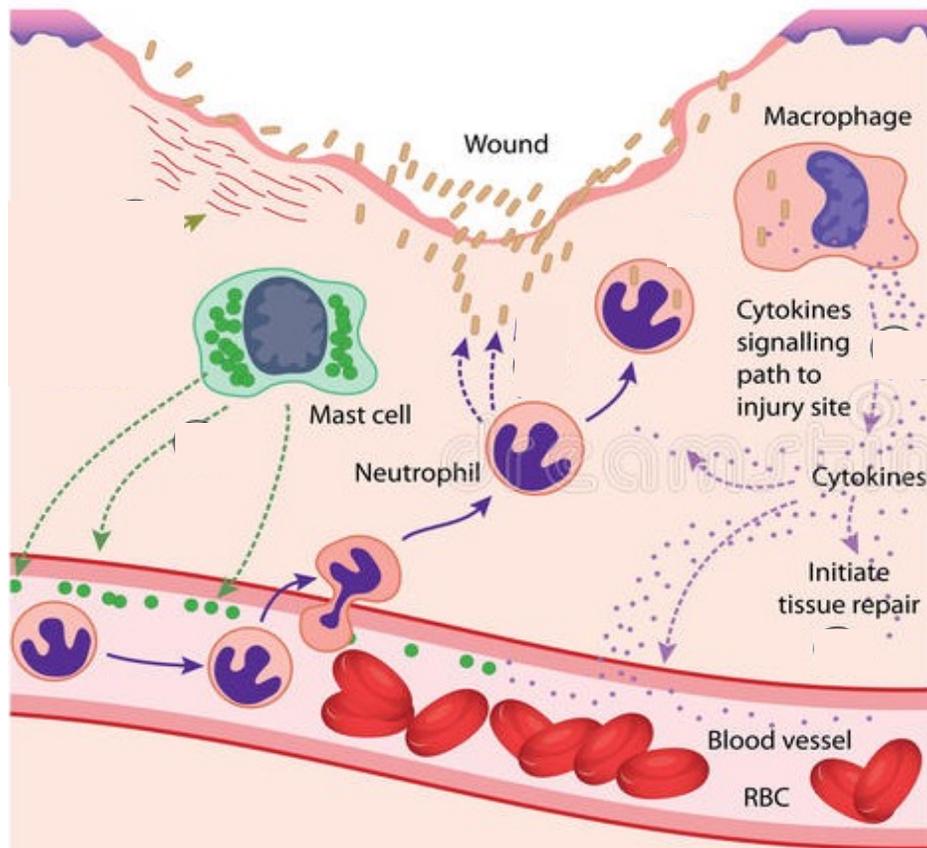


Cellule responsabili della produzione di citochine proinfiammatorie nel sito leso

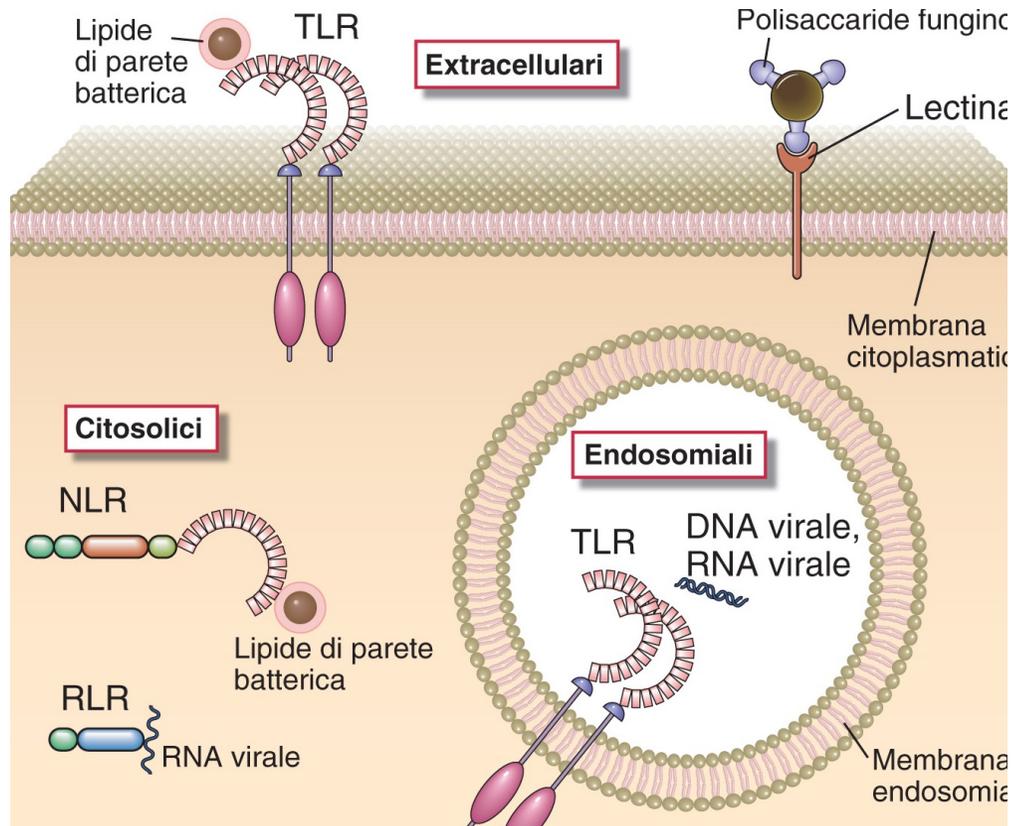


I macrofagi e le cellule dendritiche nel tessuto infetto o leso sono attivati dal riconoscimento di prodotti microbici o di danno tissutale e partecipano al processo infiammatorio attraverso la produzione di citochine e chemochine.

Le citochine e le chemochine rilevanti nella infiammazione acuta includono:

- TNF- α
- IL-1 β
- IL-6
- IL-8
- CCL2

La produzione di citochine pro-infiammatorie dipende dal riconoscimento di microrganismi e molecole del danno tissutale da parte dei macrofagi, mastociti e cellule dendritiche



Le cellule dell'immunità innata presentano recettori denominati PRR (Pathogen recognition receptor) deputati al riconoscimento di agenti infettivi (Pathogen associated molecular patterns =PAMPs) o sostanze rilasciate da cellule morte (Damage associated molecular patterns=DAMPs).

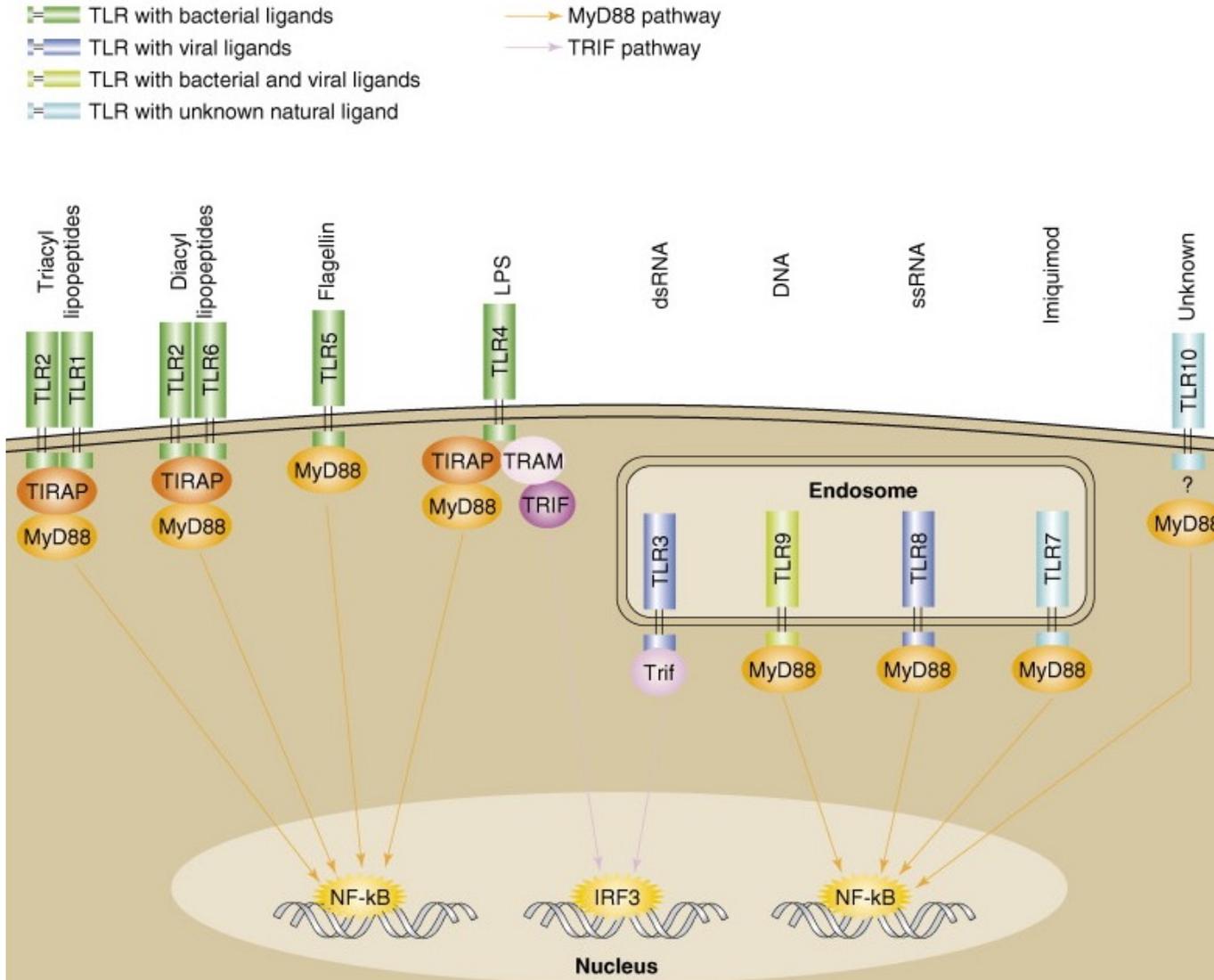
Questi includono:

I Toll like receptor (TLR)= TLR1-10 (uomo) e TLR 1-9, TLR11-13 (topo) =lipidi della parete batterica, flagellina, DNA batterico, RNA.

Nod like receptors (NLR)= più di 20 proteine espresse intracellularmente es NALP1-3 (lipoproteine)

RIG-I-like receptors (RLR)=RIG-1, MDA5, LGP2 (RNA virale)

I Toll Like Receptor umani



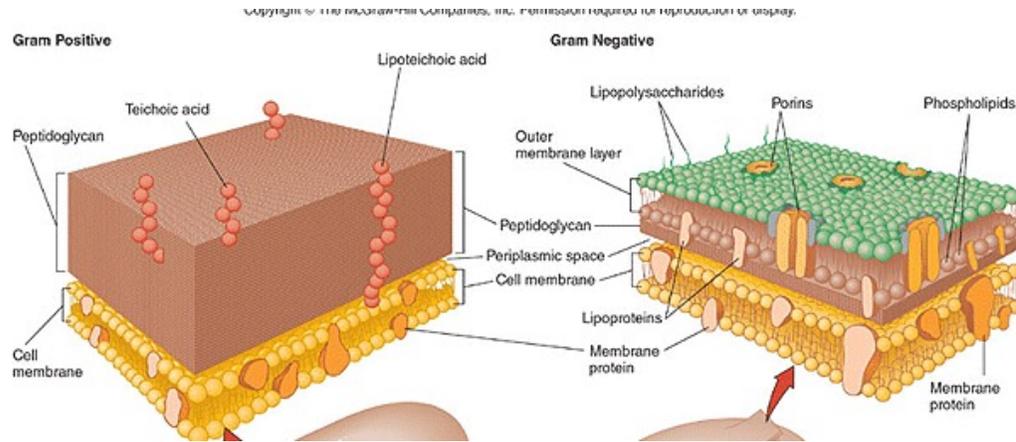
In base alla localizzazione i TLR possono essere distinti in TLR di membrana o presenti nelle vescicole intracitoplasmatiche quali gli endosomi.

Il TLR4 è stato il primo TLR descritto e si lega al LPS una componente della membrana esterna dei batteri Gram-negativi.

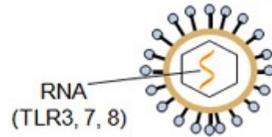
TLR1-9 nell'uomo

TLR1-9 e **TLR11-13** nel topo

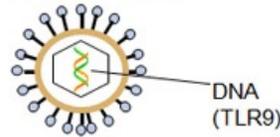
Specificità dei TLR



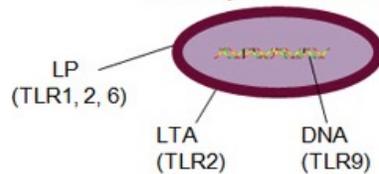
RNA viruses



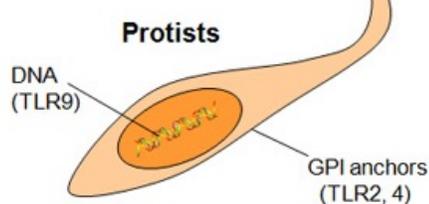
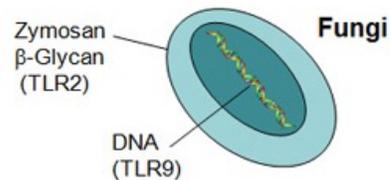
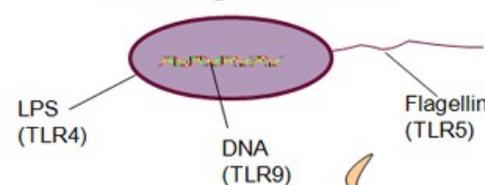
DNA viruses



Gram-positive bacteria



Gram-negative bacteria



Il **TLR4** riconosce il lipopolisaccaride presente sulla parete dei batteri Gram negativi.

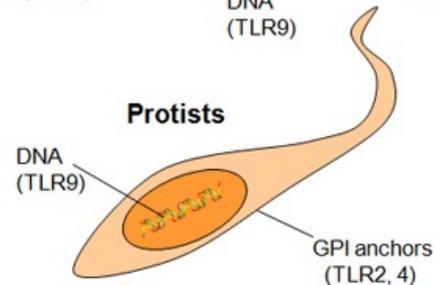
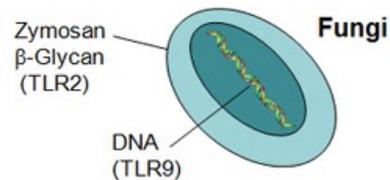
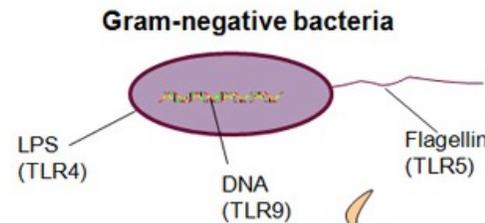
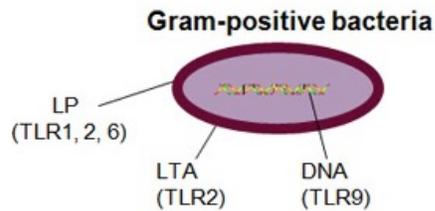
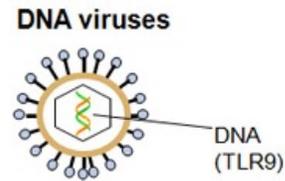
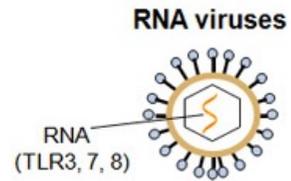
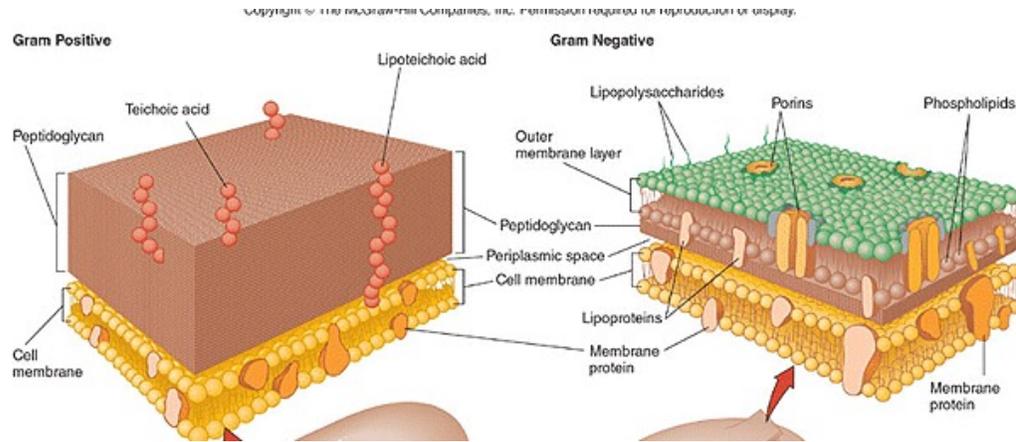
Il **TLR5** riconosce la flagellina

Il **TLR9** riconosce i motivi CpG non metilati di DNA frequenti nel DNA batterico e virale

Il **TLR3** riconosce l'RNA a doppio filamento

Il **TLR7** e il **TLR8** riconoscono l'RNA a singolo filamento

Specificità dei TLR



Il **TLR2** riconosce una vasta serie di PAMPs presenti nei batteri, funghi e parassiti che includono:

Lipopeptidi= batteri

Peptidoglicano e acido lipoteico= batteri Gram positivi

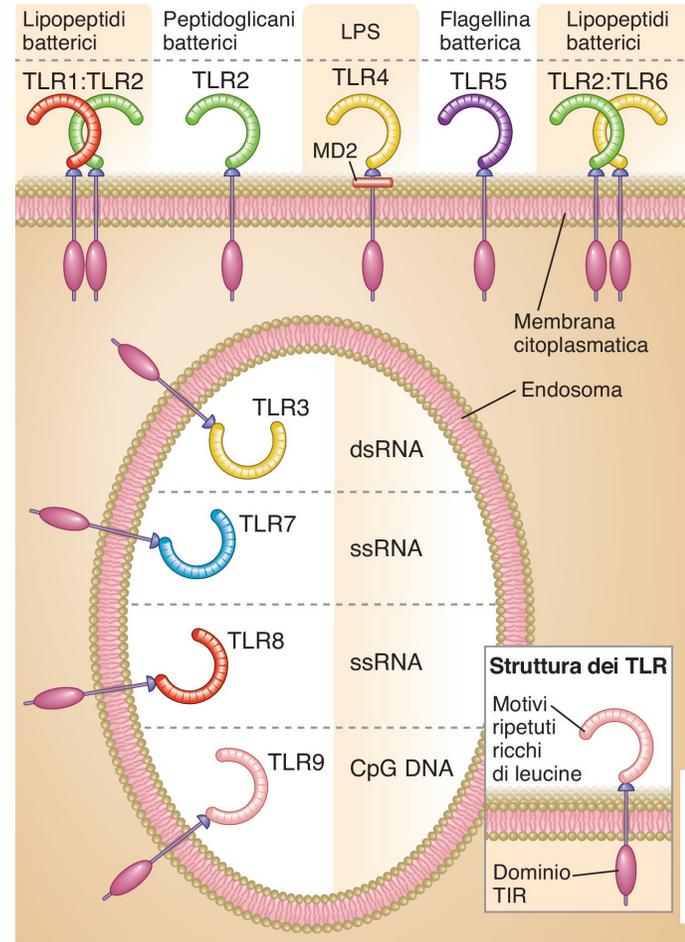
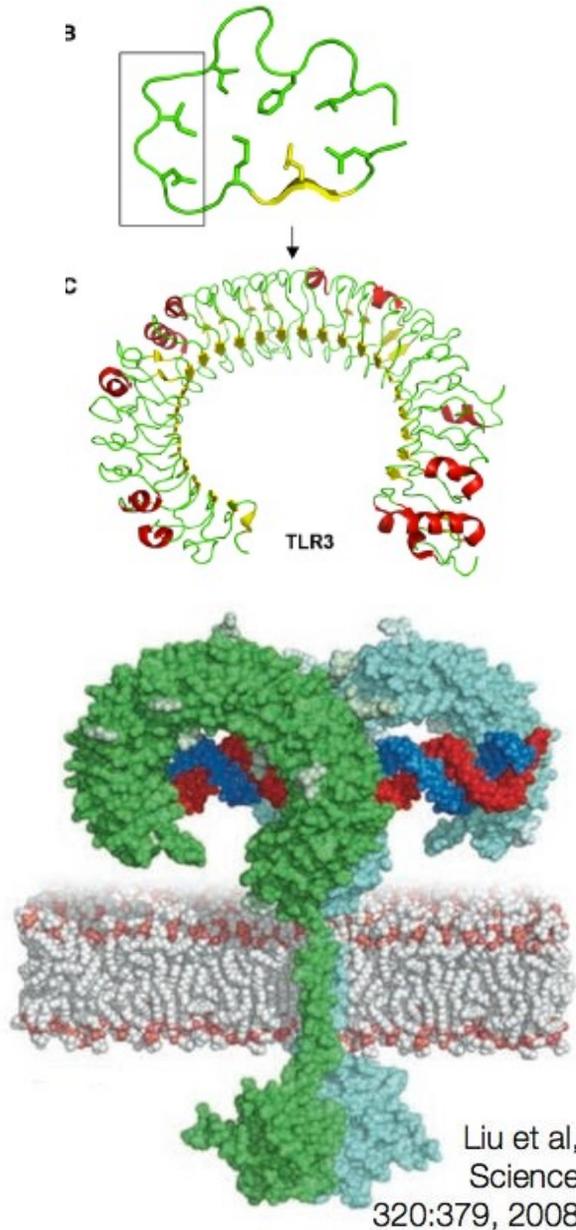
Lipoarabinomannano= micobatteri

Zimosano=funghi

TLR11= profilin nei protozoi

TLR13= RNA ribosomale batterico

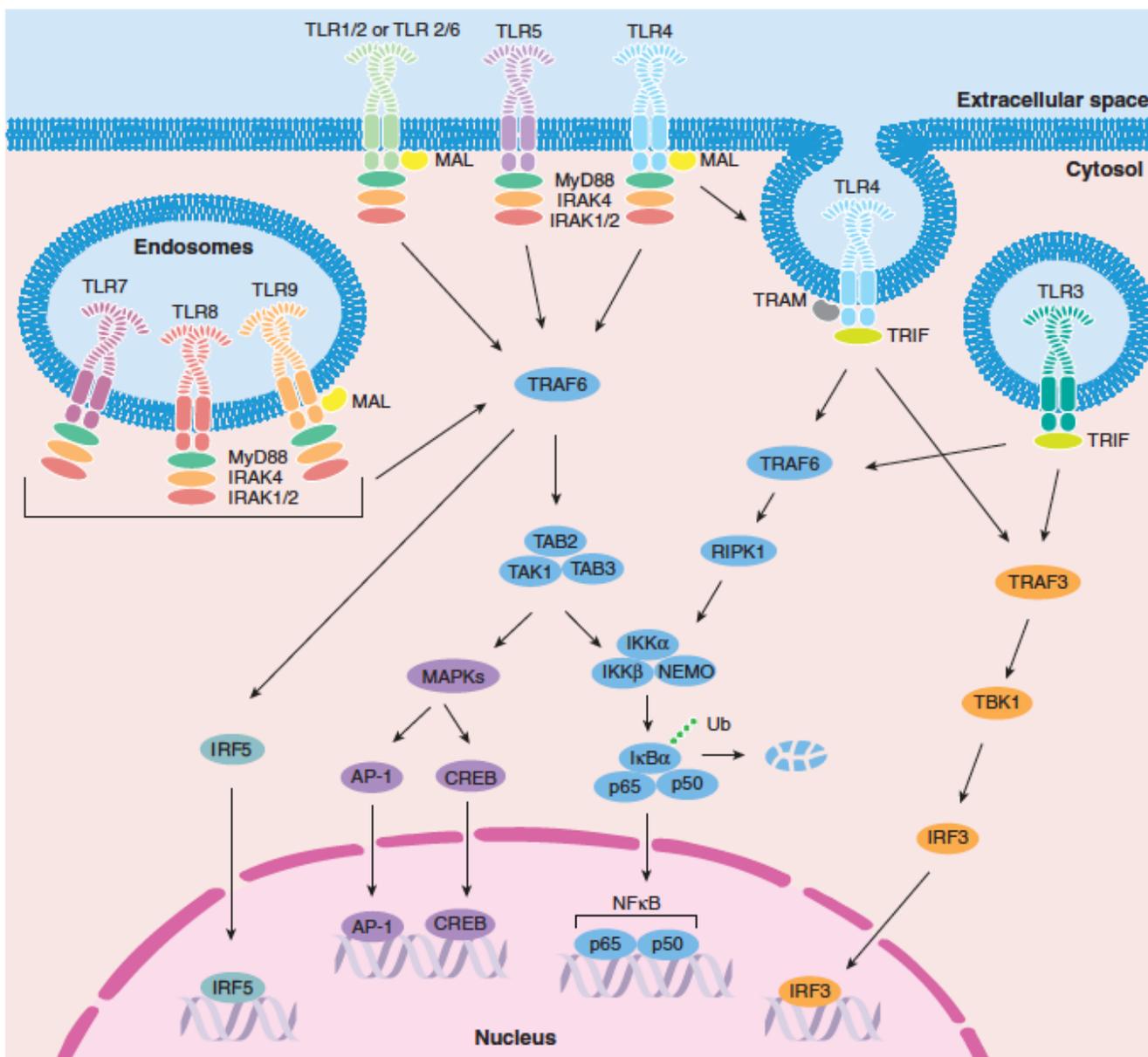
Struttura dei TLR



I toll like receptor sono glicoproteine integrali di membrana che presentano:

- nella regione extracellulare ripetizioni di sequenze ricche in leucina definite Leucin rich domain (**LRD**).
- una regione transmembrana
- nella regione intracitoplasmatica un dominio responsabile dell'attivazione cellulare definito **TIR** (Toll/IL-1 receptor homology domain)

Segnalazione da parte dei TLR



L'interazione fra il TLR con il suo ligando determina un cambiamento conformazionale nel dominio intracellulare TIR che induce il reclutamento di proteine adattatrici che legano il dominio intracitoplasmatico mediante l'interazione omotipica TIR-TIR.

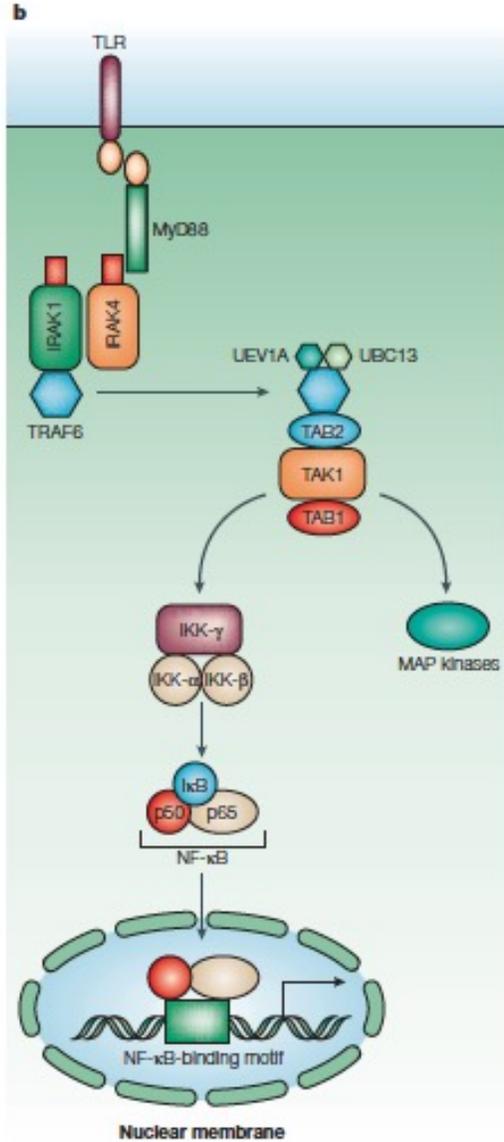
Queste includono:

- Myeloid differentiation factor 88 (**MyD88**),
- TIR domain containing adaptor molecule (**TRIF**),
- MyD88 adaptor like (**MAL/TIRAP**)
- TRIF-related adaptor molecule (**TRAM**)
- sterile α - e armadillo -motif-containing protein (**SARM**).

I TLR trasducono il segnale mediante due vie principali.

- MyD88 \longrightarrow porta alla produzione di citochine infiammatorie
- TRIF \longrightarrow induce l'espressione degli interferoni di tipo I ($\text{IFN}\alpha/\beta$)

Tutti i TLR trasducono il segnale attraverso un meccanismo che utilizza MyD88 tranne il TLR3 che utilizza esclusivamente TRIF.



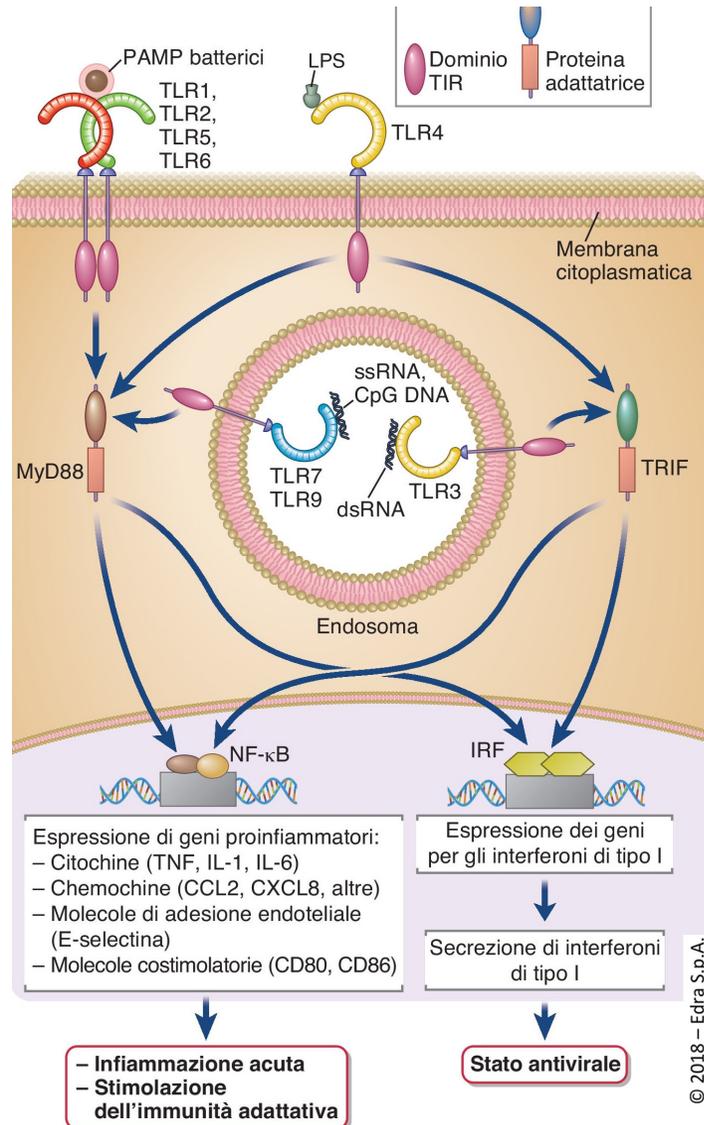
La cascata di trasduzione dipendente da MyD88 culmina nella attivazione della chinasi TAK1 che attiva NF- κ B e la via delle MAPK (mitogen activated protein kinase). La via delle MAP chinasi cumina con l'attivazione di fattori trascrizionali quali AP1.

NF- κ B e fattori trascrizionali attivati dalle MAPK mediano la trascrizione delle citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β) e delle chemochine (IL-8, MCP-1) .

Espressione di geni proinfiammatori:

- Citochine (TNF, IL-1, IL-6)
- Chemochine (CCL2, CXCL8, altre)
- Molecole di adesione endoteliale (E-selectina)
- Molecole costimolatorie (CD80, CD86)

Vie di trasduzione del segnale e funzioni dei TLR



La cascata di trasduzione dipendente da MyD88 culmina nella attivazione di NF-κB e delle MAPK.

NF-κB e i fattori trascrizionali attivati dalle MAPK mediano la trascrizione delle citochine proinfiammatorie (TNF-α, IL-6, IL-12, IL-1β) e delle chemochine (IL-8, MCP-1).

004.003.07002347010.sp
 Immunologia cellulare e molecolare (10a edizione)
 Vie di trasduzione del segnale e funzioni dei TLR1, TLR2, 4, 5 e 6 allungano la cascata adattativa MyD88 e attivano il fattore trascrizionale NF-κB e AP-1. TLR3 utilizza l'adattatore TRIF e attiva il fattore trascrizionale IRF3 e IRF7. TLR4 può attivare entrambe le vie. TLR7, TLR8 e TLR9 utilizzano MyD88 all'interno dell'endosoma e attivano via NF-κB (via IRF7, IRF3, IRF9) e via IRF3/IRF7. IRF3/IRF7/IRF9 formano il complesso ISGF3. IRF3/IRF7/IRF9 formano il complesso ISGF3. IRF3/IRF7/IRF9 formano il complesso ISGF3.

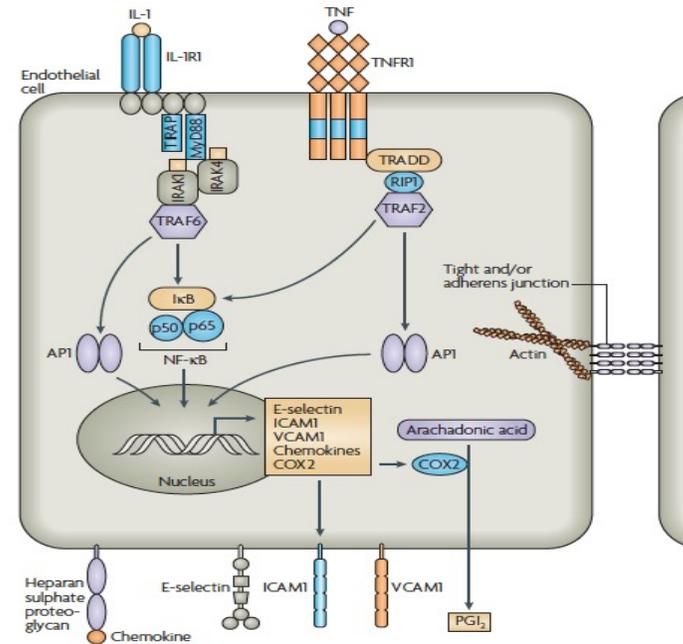
Le principali citochine pro-infiammatorie: TNF- α , IL-1, IL-6



Il **TNF- α** è sintetizzato come proteina omotrimerica di membrana non glicosilata. Il taglio della forma di membrana causa il rilascio di frammenti polipeptidici tre dei quali polimerizzano.

Esistono due tipi di recettori per il TNF- α (TNFR1 e TNFR2) che sono espressi su quasi tutti i tipi cellulari. L'interazione del TNF- α oltre a portare all'attivazione di NF- κ B può causare morte cellulare. Nel processo infiammatorio attiva l'endotelio inducendo l'espressione di molecole di adesione e la produzione di eicosanoidi e chemochine.

Il TNF- α è prodotto principalmente dai macrofagi e dai monociti.

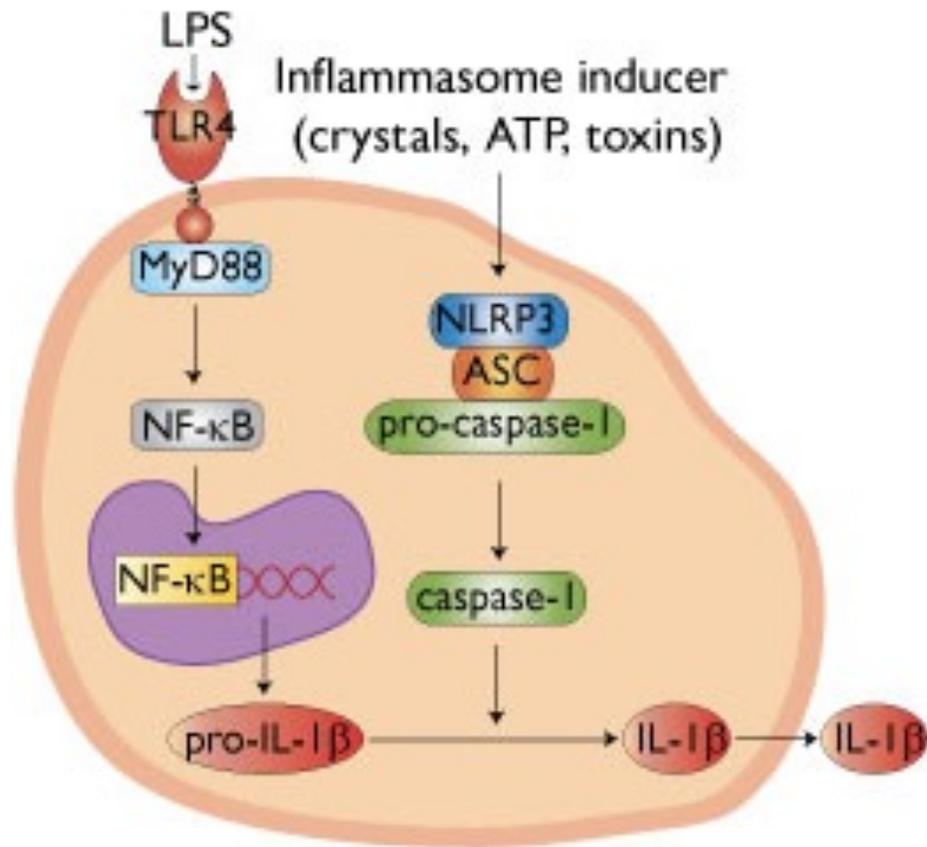


L'**IL-1** viene prodotta da molti tipi cellulari.

Esistono due forme: IL-1 α e IL-1 β . La principale forma prodotta è l'IL-1 β che ha bisogno di due segnali per essere prodotta: stimolazione del TLR e attivazione dell'inflammasoma per attivare la caspasi che effettua un taglio nella pro-IL-1 β . Nell'infiammazione ha ruoli simili al TNF- α .

IL-6 stimola la produzione dei neutrofili nel midollo. Induce la sintesi delle proteine di fase acuta nel fegato.

La forma attiva dell'IL-1 β dipende anche dall'attivazione dei Nod like receptors NLRP (NLR family, Pyrin-Domain-Containing –Proteins)



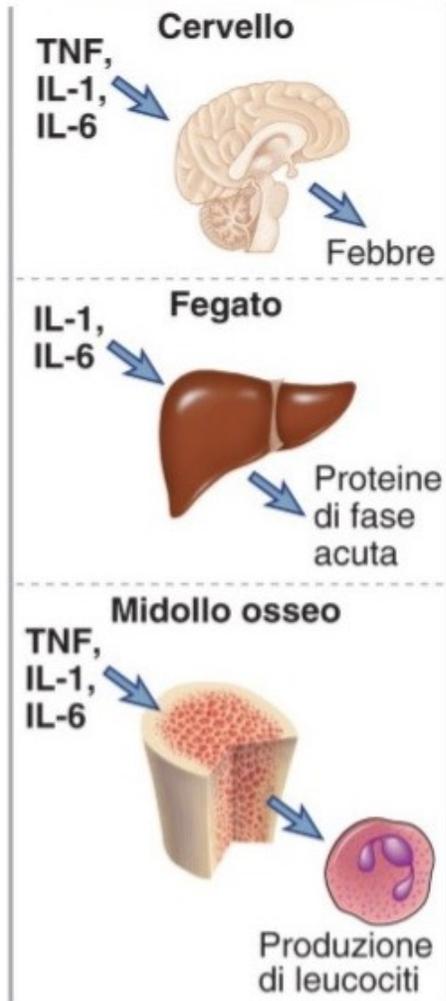
IL-1 β è espressa come precursore pro-IL1 β e la sua attivazione richiede la processazione da parte della caspasi 1. Le molecole NLRP in seguito ad attivazione formano complessi multimolecolari definiti inflammasoma in cui viene reclutata la cistein proteasi caspasi-1 responsabile dell'attivazione dell'IL-1 β . Il reclutamento della cistein proteasi avviene attraverso l'adattatore ASC.

IL-6



- Stimola la produzione di neutrofili nel midollo
- Induce la sintesi delle proteine di fase acuta nel fegato
- Promuove il differenziamento dei linfociti T CD4+
- Induce la proliferazione di altre cellule (cheratinociti)

Effetti sistemici protettivi



Effetti sistemici dell'inflammatione

Gli effetti sistemici dell'inflammatione sono definiti reazione di fase acuta e sono mediati principalmente dal TNF- α , l'IL-1 β e l'IL-6. Queste citochine oltre ad agire localmente sono rilasciate a livello sistemico.

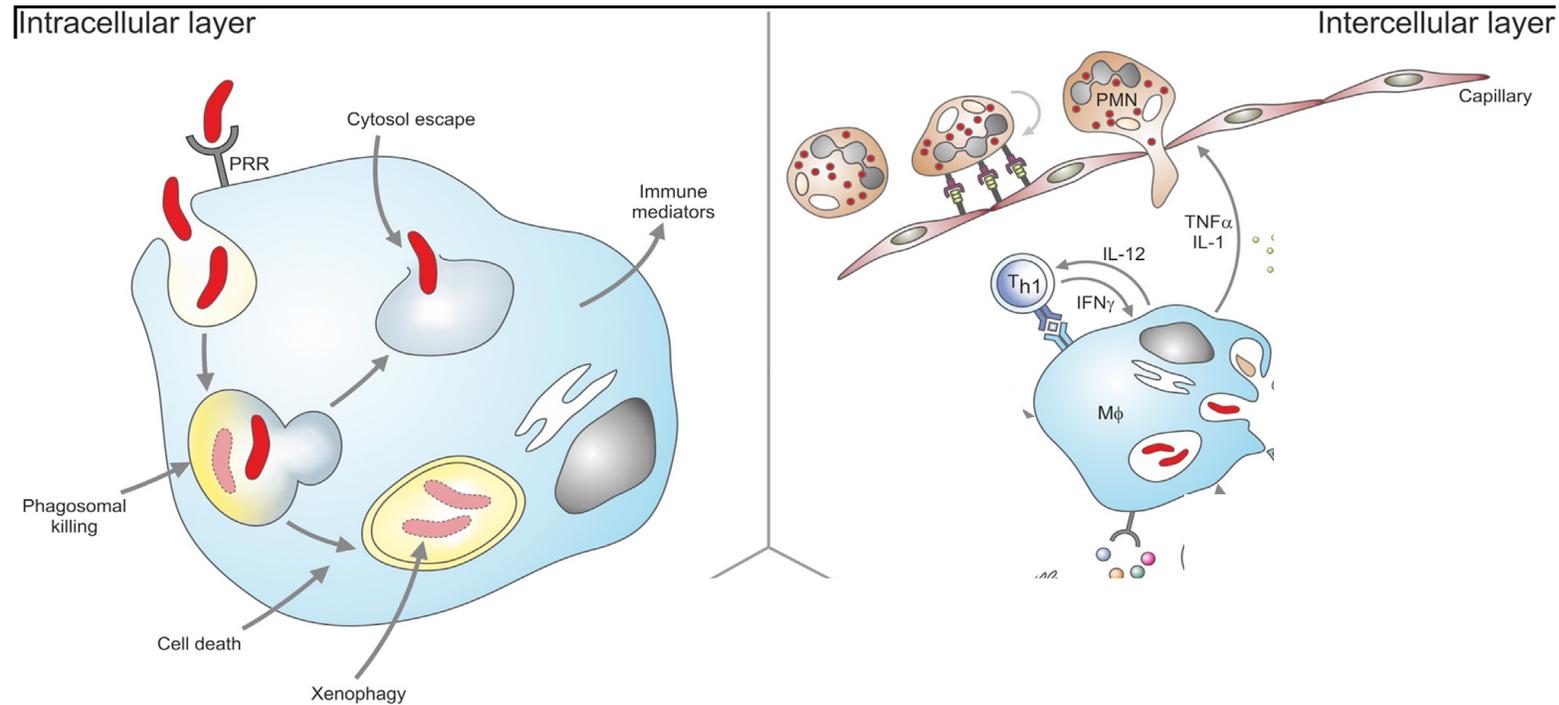
La risposta di fase acuta è costituita da:

- **febbre.** L'IL-1 β e il TNF- α stimolano la sintesi di prostaglandine aumentando i livelli di ciclossigenasi nelle cellule vascolari e perivascolari dell'ipotalamo. Nell'ipotalamo le prostaglandine, specialmente la PGE₂, stimola la produzione di neurotrasmettitori che regolano la temperatura corporea.
- **aumento dei livelli plasmatici delle proteine di fase acuta.** La concentrazione di alcune proteine plasmatiche può aumentare di centinaia di volte nell'inflammatione acuta. Tra queste le più note sono la proteina C-reattiva (PCR), il fibrinogeno e la proteina sierica A. L'IL-6 stimola la produzione di queste proteine da parte degli epatociti. Il fibrinogeno si lega agli eritrociti determinando la formazione di ammassi di eritrociti che sedimentano più velocemente. In questo modo si misura la VES. Misurazioni della VES e dei livelli di PCR sono utilizzate per valutare la presenza di inflammatione.
- **leucocitosi.** L'aumento del numero di leucociti in circolo è dovuto al rilascio di cellule dal midollo osseo. La popolazione cellulare che risulta aumentata è determinata dal tipo di infezione es: neutrofili in infezioni batteriche.

Funzione delle citochine pro-infiammatorie

Citochina	Dimensione	Principale fonte cellulare	Principali bersagli cellulari
Fattore di necrosi tumorale (TNF- α)	17kD secreto come omotrimerico	Macrofagi	Cellule endoteliali: attivazione Neutrofili: attivazione Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi di proteine di fase acuta
Interleuchina-1 β (IL-1 β)	Forma matura 17 kD precursore 33 kD	Macrofagi, cellule endoteliali, alcune cellule epiteliali	Cellule endoteliali: attivazione Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi di proteine di fase acuta
Interleuchina-6 (IL-6)	19-26 kD	Macrofagi, cellule endoteliali	Fegato: sintesi di proteine di fase acuta
Chemochine	8-12kD	Macrofagi, cellule endoteliali	Leucociti: attivazione, migrazione nei tessuti

Funzioni difensive mediate dai macrofagi nelle infezioni microbiche

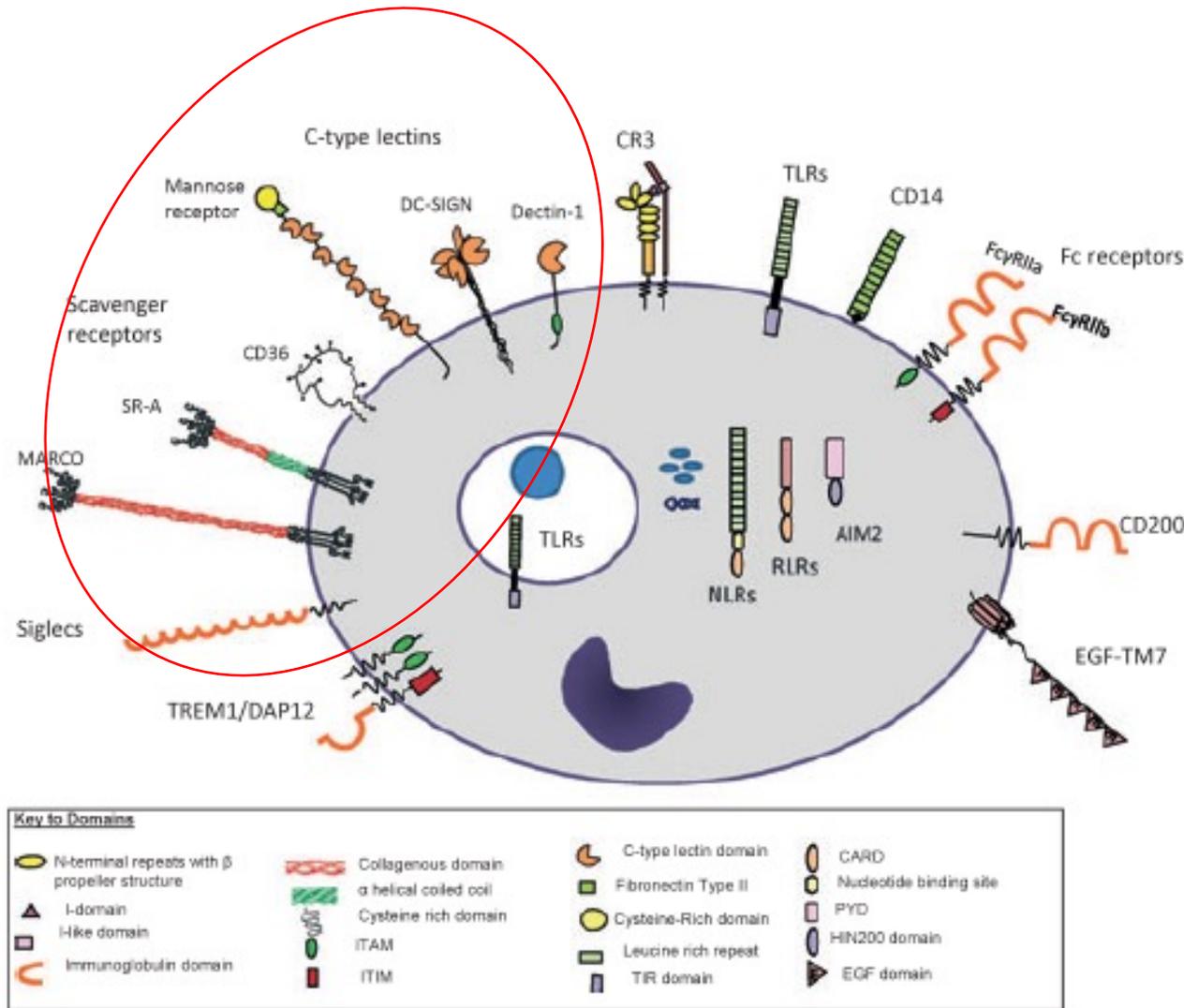


Nel corso delle infezioni microbiche i macrofagi esplicano le funzioni difensive a diversi livelli.

A livello cellulare: captano e distruggono i microrganismi

a livello intercellulare: secernono mediatori in grado di reclutare i leucociti aumentando la risposta difensiva contro i patogeni.

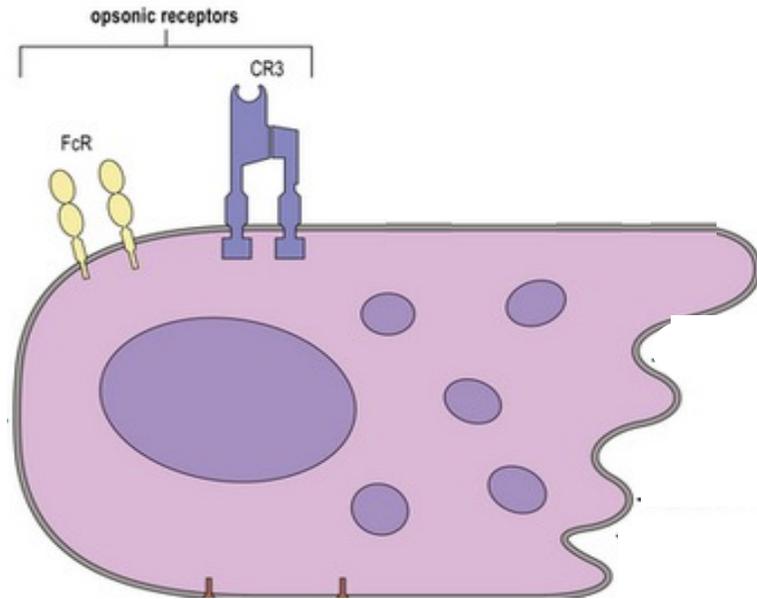
Recettori deputati al riconoscimento dei microorganismi da parte dei macrofagi



I macrofagi esprimono diversi recettori deputati al riconoscimento dei patogeni. Questi includono

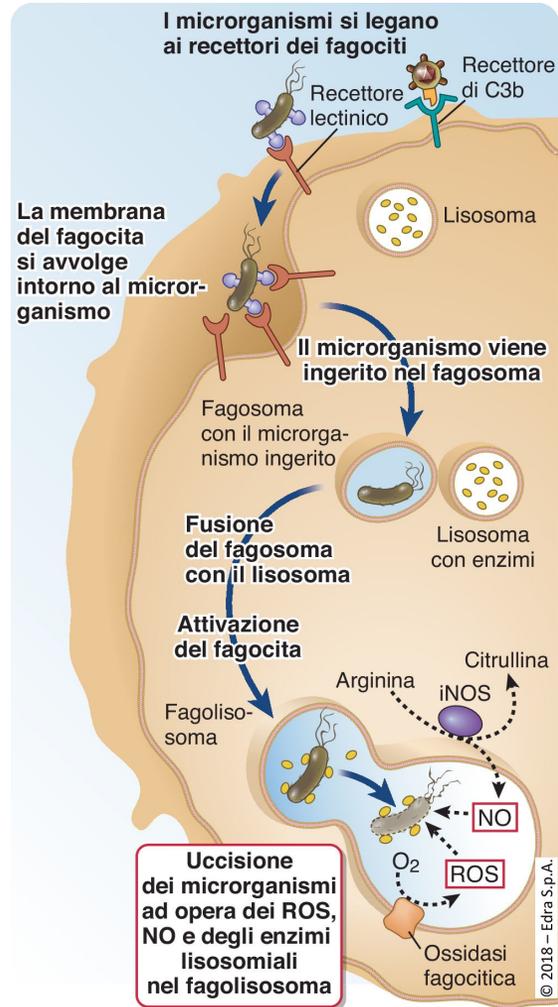
- i) recettori che mediano la captazione del patogeno come i recettori lectinici di tipo C (mannose receptor, DC-SIGN) gli Scavenger receptor (lipopeptidi batterici)
- ii) recettori opsonici.
- iii) “sensing” receptor. I sensing receptor avviano una cascata di segnalazione intracellulare che culmina con l’espressione di geni coinvolti nella risposta difensiva contro i patogeni e nell’attivazione della risposta infiammatoria.

Recettori opsonici dei macrofagi



La captazione dei patogeni e degli antigeni può essere facilitata dalle opsonine. Le opsonine sono fattori dell'ospite come le immunoglobuline e fattori del complemento che si legano alla superficie del patogeno e che sono riconosciuti da recettori espressi dai fagociti. CR1, CR3 recettori del frammento C3b e C3bi del complemento, CD64 recettore ad alta affinità per le IgG.

Fagocitosi ed eliminazione intracellulare del microbo



I microorganismi vengono internalizzati nei fagosomi che si fondono con i lisosomi a formare i fagolisosomi in cui i microbi sono uccisi da:

- Specie reattive dell'ossigeno (O_2^- , H_2O_2)
- Enzimi lisosomiali
- NO e dagli enzimi proteolitici.

Eliminazione dei patogeni da parte dei macrofagi

L'eliminazione dei patogeni internalizzati avviene nel fagolisosoma. Il fagolisosoma è ricco in proteasi, idrolasi ed ha un pH acido. Il fagosoma va incontro ad un processo di maturazione.

L'acquisizione dell'attività litica del vacuolo dipende dall'interazione di questo con il pathway endocitico. Il pathway endocitico è organizzato in un continuo di organelli che va dagli early endosomes fino al lisosoma.

il fagosoma appena formato acquisisce rapidamente le caratteristiche degli early endosomes originando dalla fusione con questi ed esprime la molecola Rab5. Il pH del fagosoma a questo stadio è di circa 6.

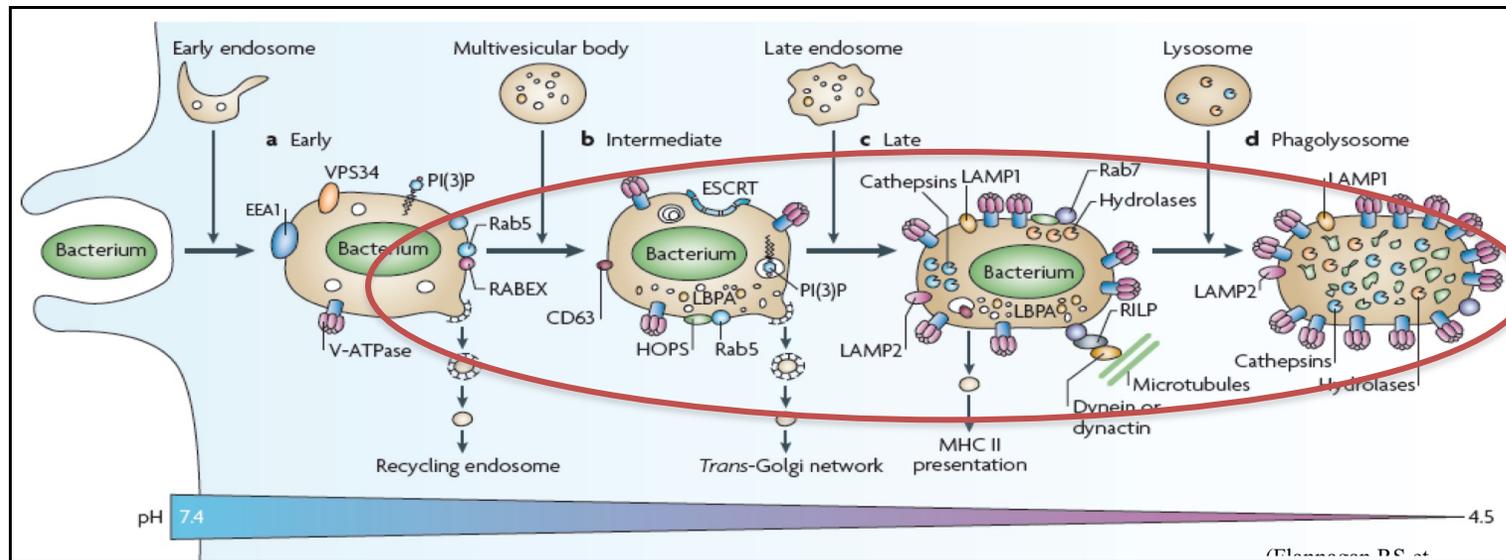
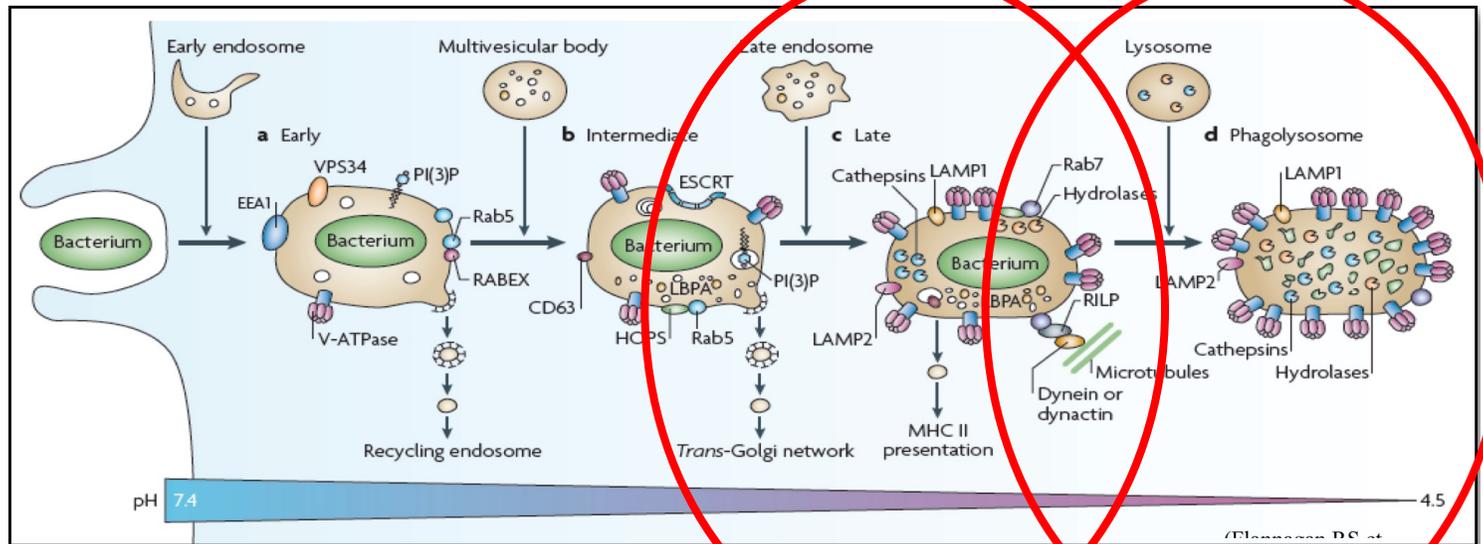


Table 1 Molecular markers of sorting and late endosomes, lysosomes, early and late phagosomes and phagolysosomes

The pH values listed for the endocytic organelles are from Chinese hamster ovary cells [31]. The phagosomal pH acidifies to pH ~ 5 within the first 5 min [213].

Organelle	Markers	pH
Sorting endosome; early phagosome	EEA1, Rab5, PI(3)P, syntaxin 13, transferrin, VAMP-3	≈ 6.0
Late endosome; late phagosome	Rab7, Rab9, mannose 6-phosphate receptor, syntaxin 7, LAMPs, lysobisphosphatidic acid	5.5–6.0
Lysosome; phagolysosome	LAMPs, mature cathepsin D, fluid-phase markers chased for ≥ 2 h	4.5–5.5

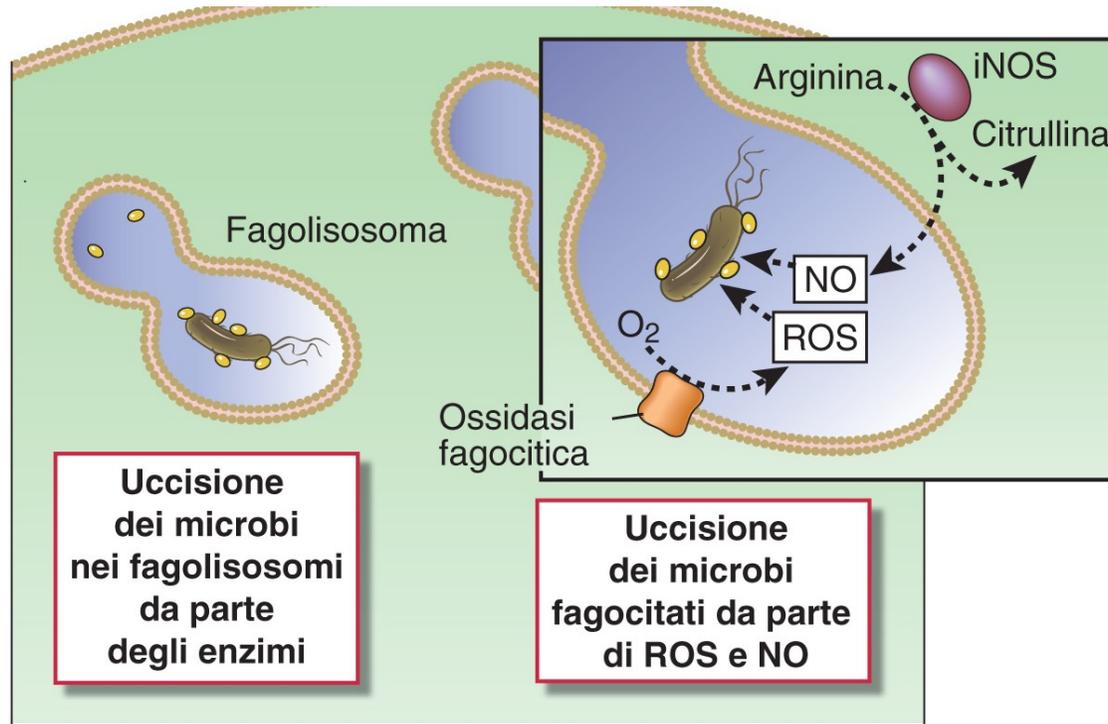
Maturazione del fagosoma



Nello stadio di maturazione successivo il fagosoma precoce si fonde con gli endosomi tardivi e acquisisce un pH più acido (5.5-6) dovuto all'azione della pompa di protoni V-ATPasi. Il fagosoma tardivo esprime la molecola Rab7.

Il processo di maturazione del fagosoma culmina con la formazione del fagolisosoma dovuto alla fusione del fagosoma tardivo con il lisosoma mediante l'azione di proteine SNARE (VAMP7, VAMP8, Syntaxin). Questo compartimento ha un pH acido (4.5) ed è ricco di enzimi litici che lo rendono ostile alle sostanze fagocitate.

Meccanismi di uccisione dei macrofagi



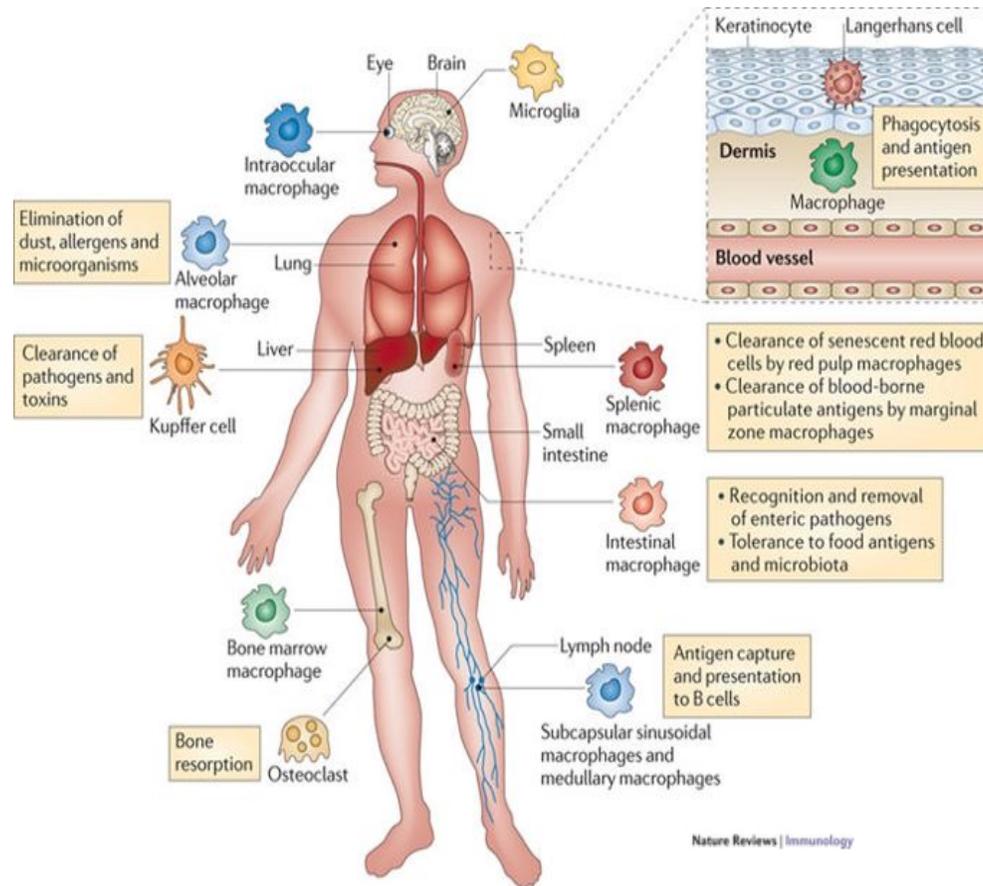
ROS (NADPH ossidasi)

NO (iNOS)

Enzimi lisosomiali

Ossido nitrico sintetasi: catalizza la formazione di ossido nitrico a partire dall'arginina.

Distribuzione tissutale dei macrofagi



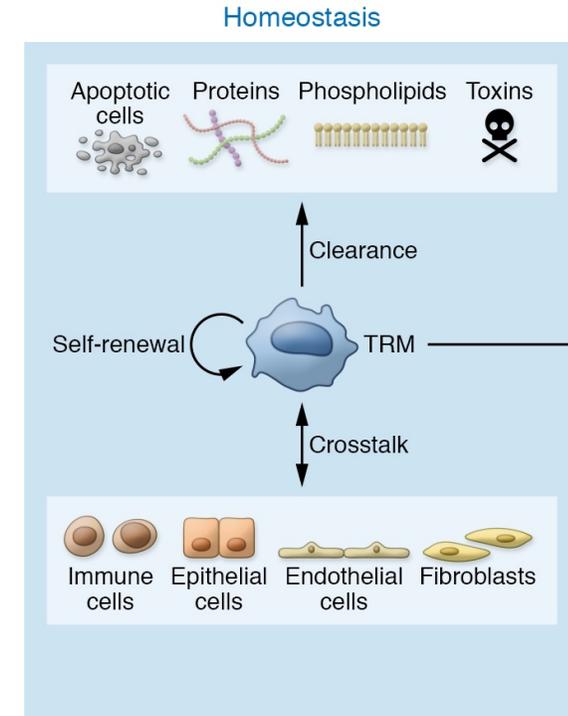
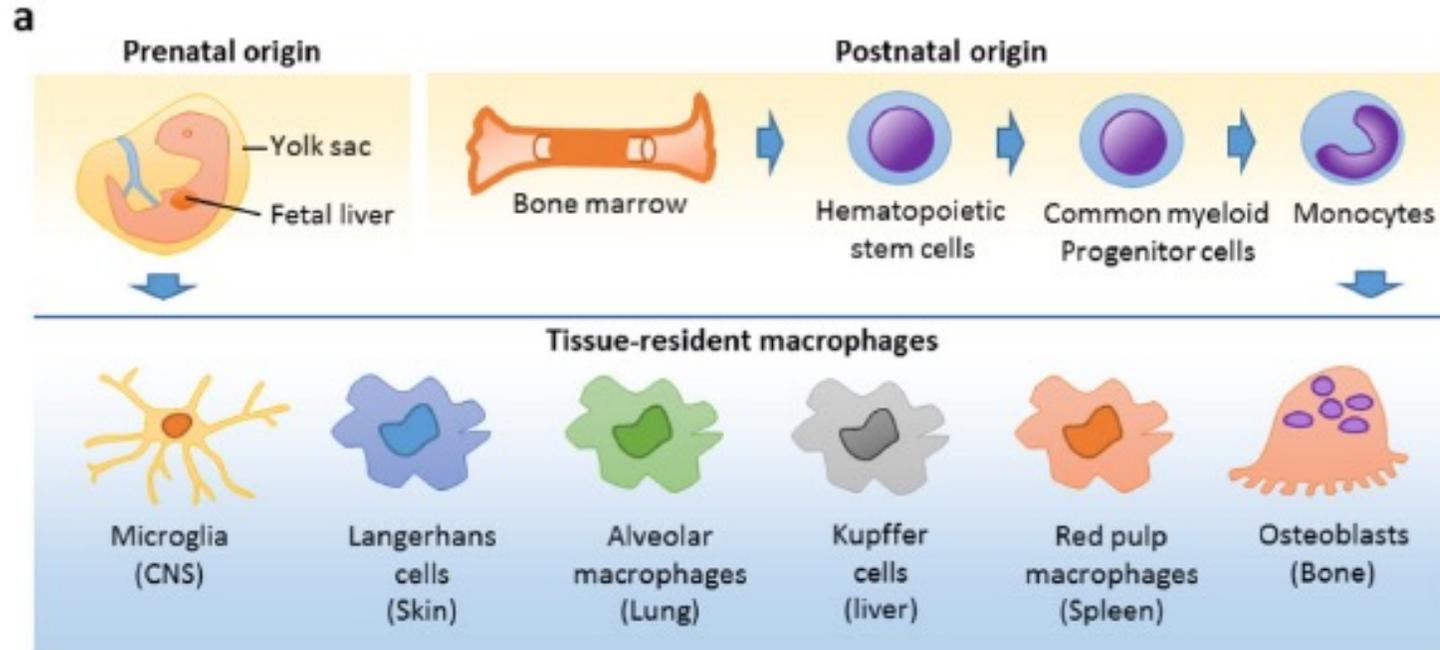
I macrofagi residenti nei diversi tessuti includono gli **osteoclasti** (osso), i **macrofagi alveolari** (polmone), gli **istiociti** (tessuto connettivo) le **cellule di Kupffer** (fegato),. L'intestino è popolato da diversi tipi di macrofagi che insieme alle cellule dendritiche mantengono la tolleranza 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.

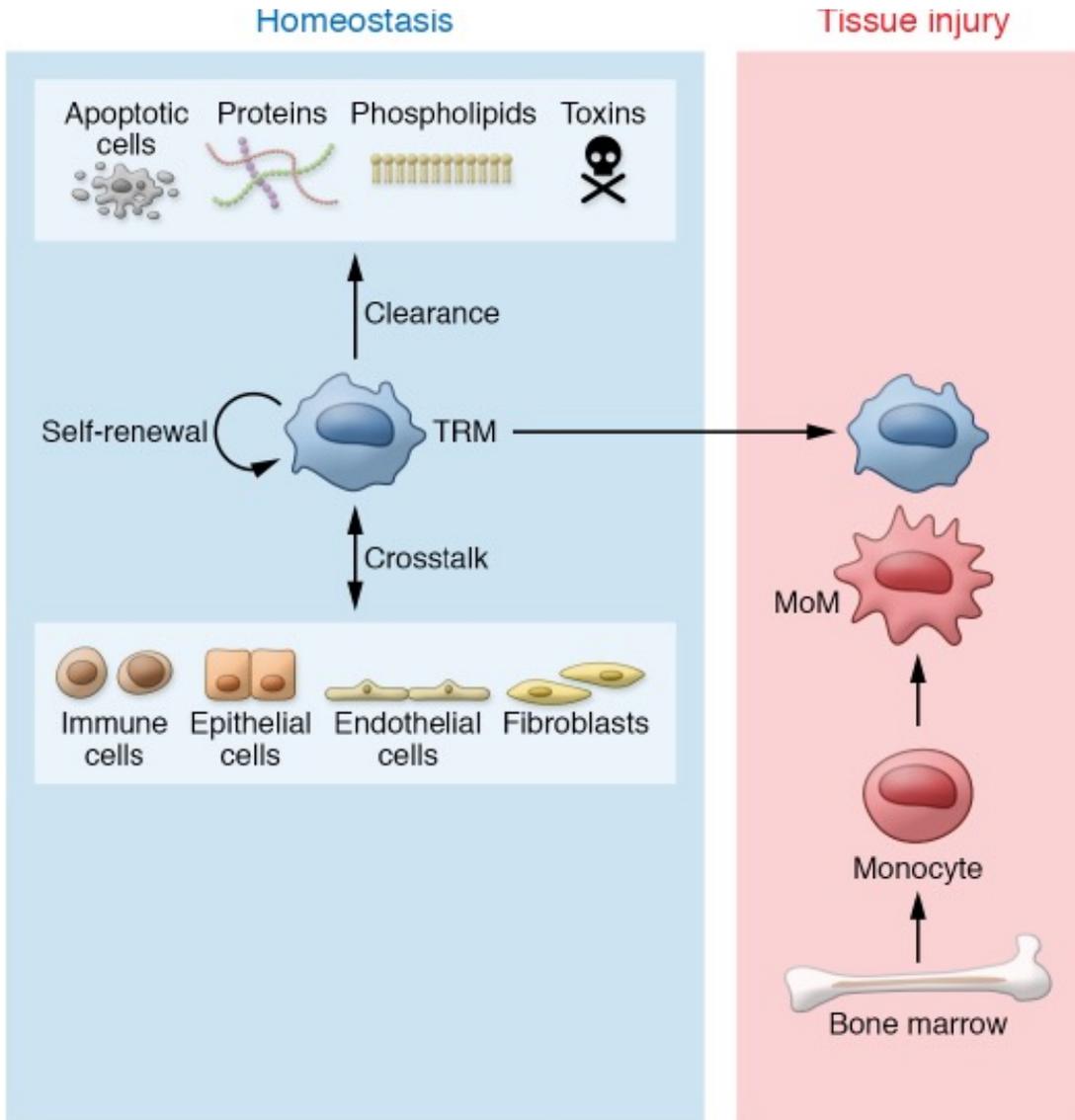
2) agiscono da sentinelle delle infezioni e del danno tissutale ingerendo le sostanze estranee e attivando la risposta infiammatoria che media il reclutamento di altre cellule quali i monociti e i neutrofili.

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.

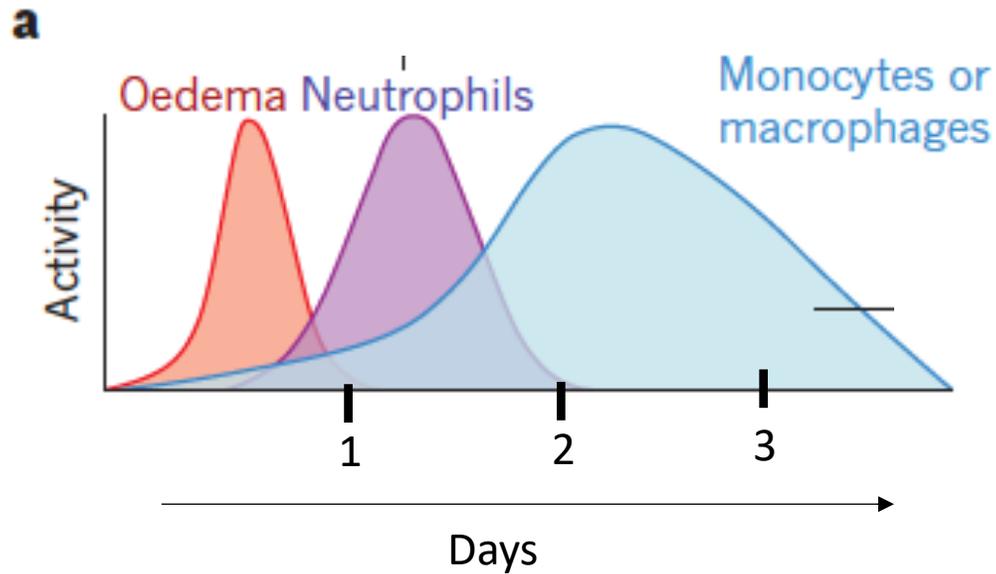
I macrofagi residenti nei tessuti e derivati dai monociti



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 derivano dai monociti.

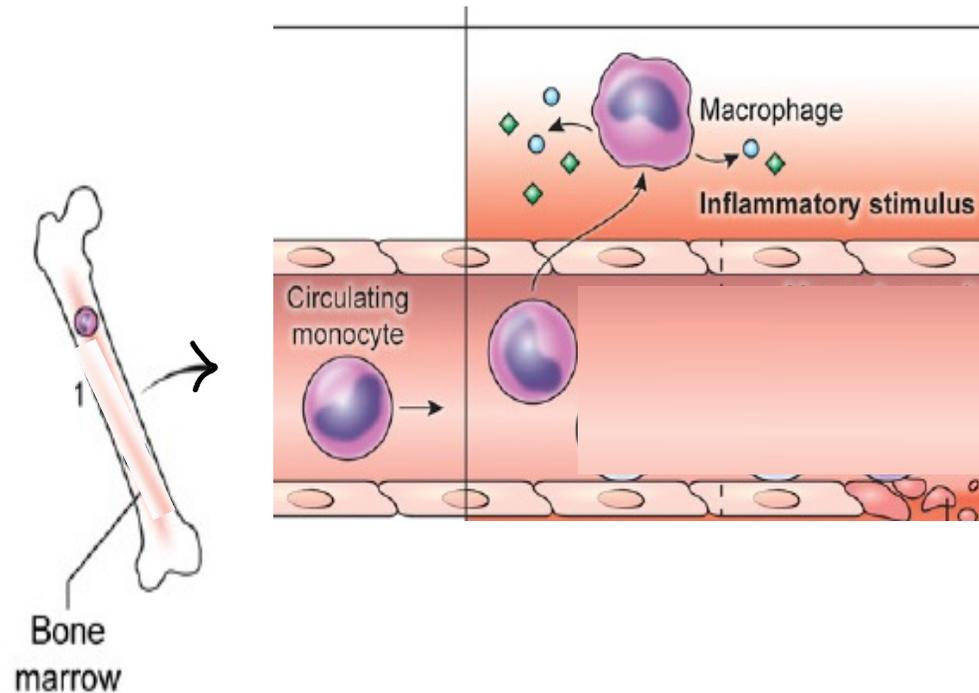
TRM= tissue resident macrophages, MoM= monocyte derived macrophages

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).

Reclutamento dei monociti nel sito leso

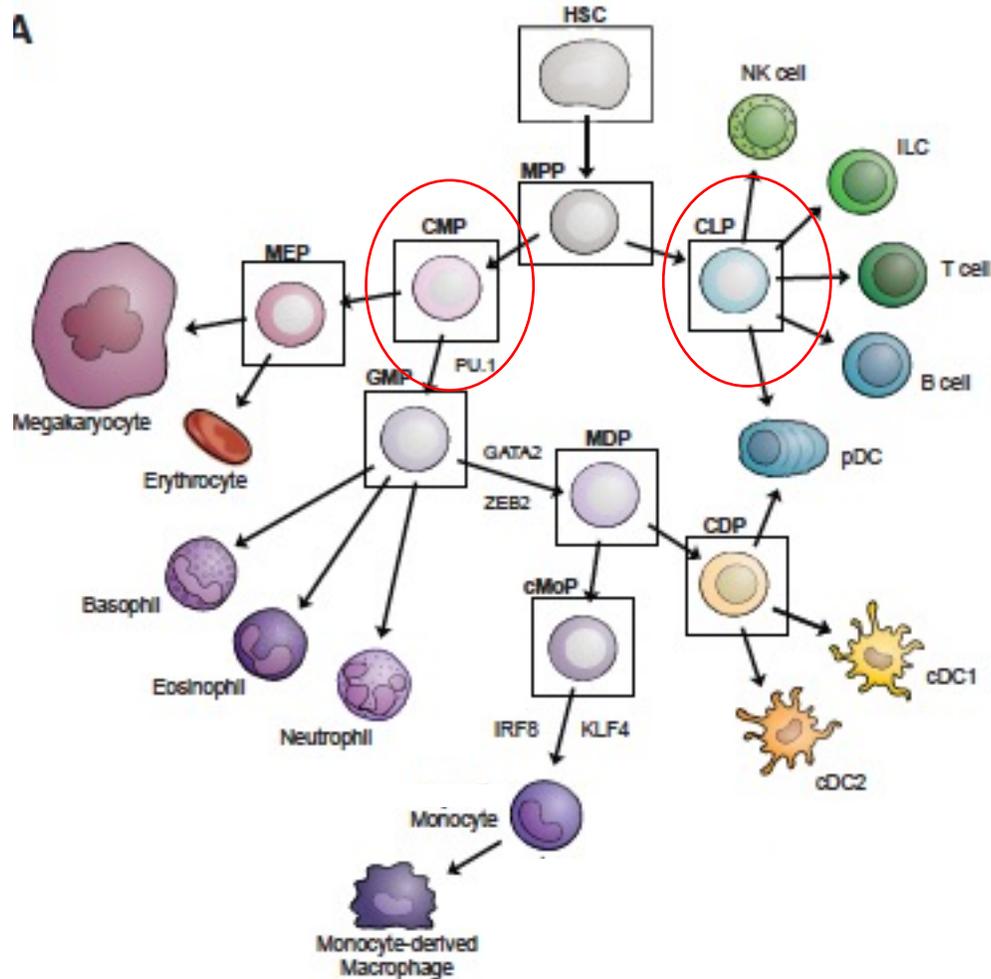


Durante l'induzione della risposta infiammatoria acuta i monociti vengono reclutati dal circolo sanguigno e raggiungono i siti di infiammazione richiamati dalla chemochina CCL2.

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



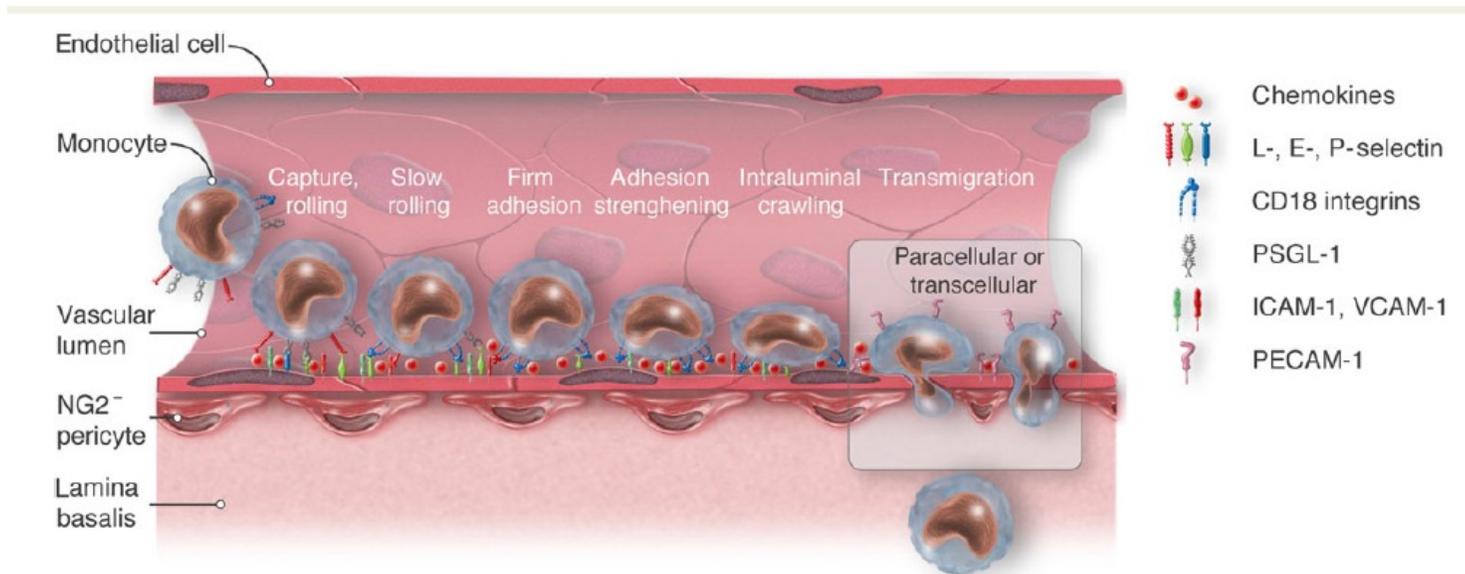
Sviluppo delle cellule del sangue nel midollo osseo:
A partire dalle cellule staminali ematopoietiche (HSC), i precursori multipotenti danno origine attraverso precursori intermedi a tutte le cellule del sangue. I precursori dei granulociti e dei macrofagi (GMP) producono i granulociti o differenziano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

Extravasazione dei monociti

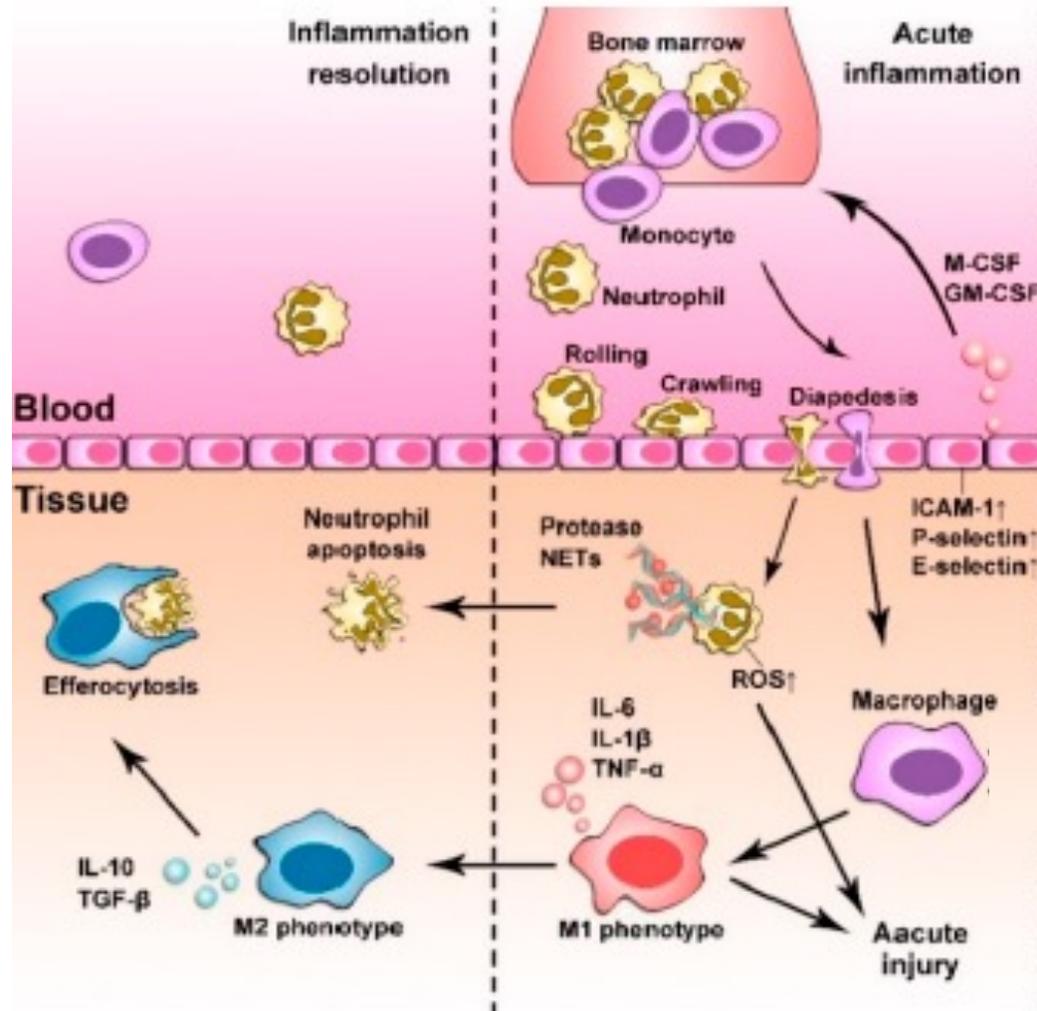
Nella extravasazione dei monociti l'interazione fra il PSGL-1 espresso dai monociti con le P- e E-selettine media l'adesione debole e il rolling.

L'adesione forte è mediata dall'interazione VLA-4 con V-CAM1 e dalla chemochina CCL2 che lega il recettore CCR2.

Il crawling dipende da LFA1, Mac1 e ICAM-1 e ICAM-2.

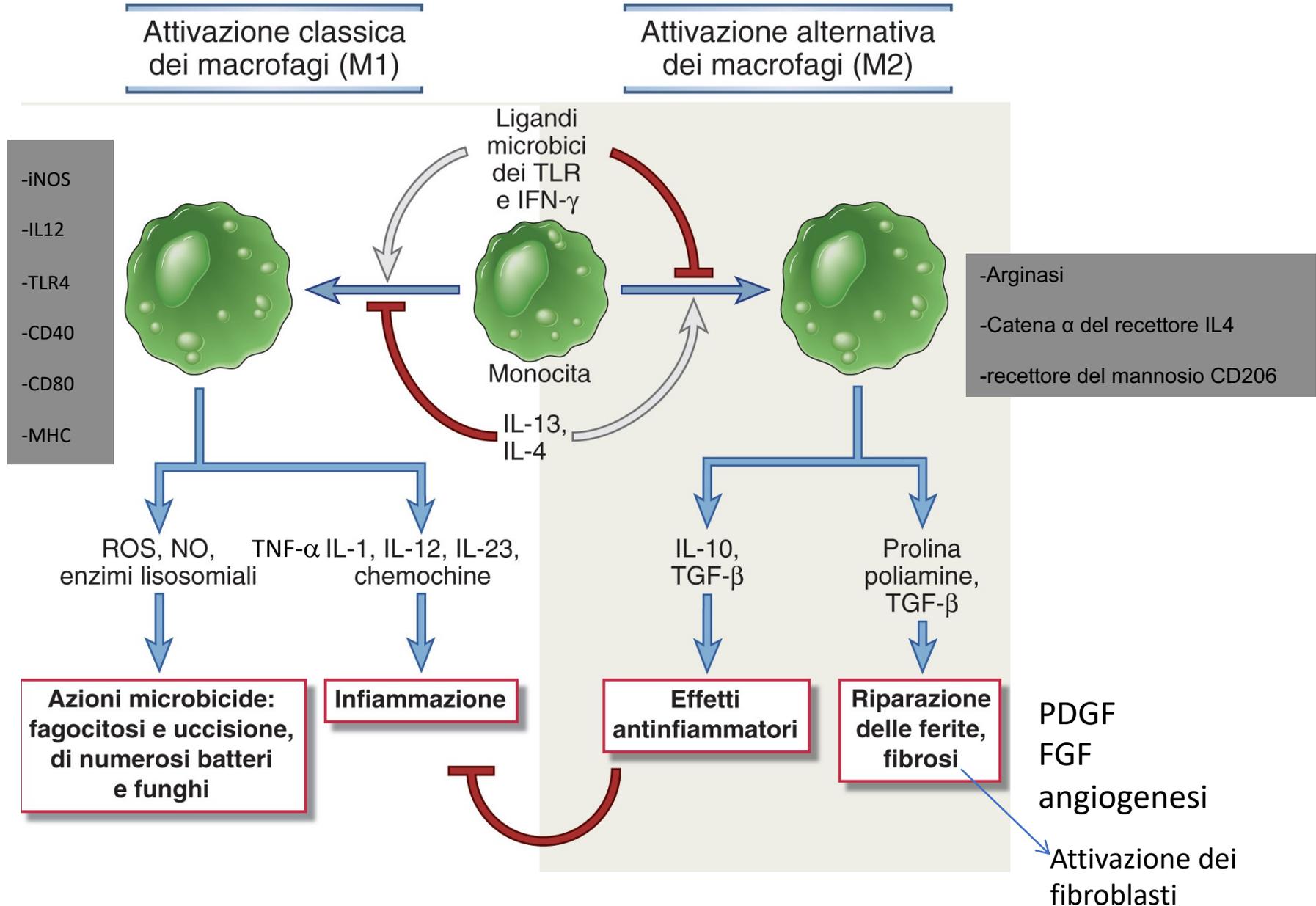


Plasticità dei macrofagi



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'inflammatione sono sostituiti dai macrofagi che promuovono la guarigione delle ferite e definiti M2.

Attivazione dei macrofagi: classica o alternativa



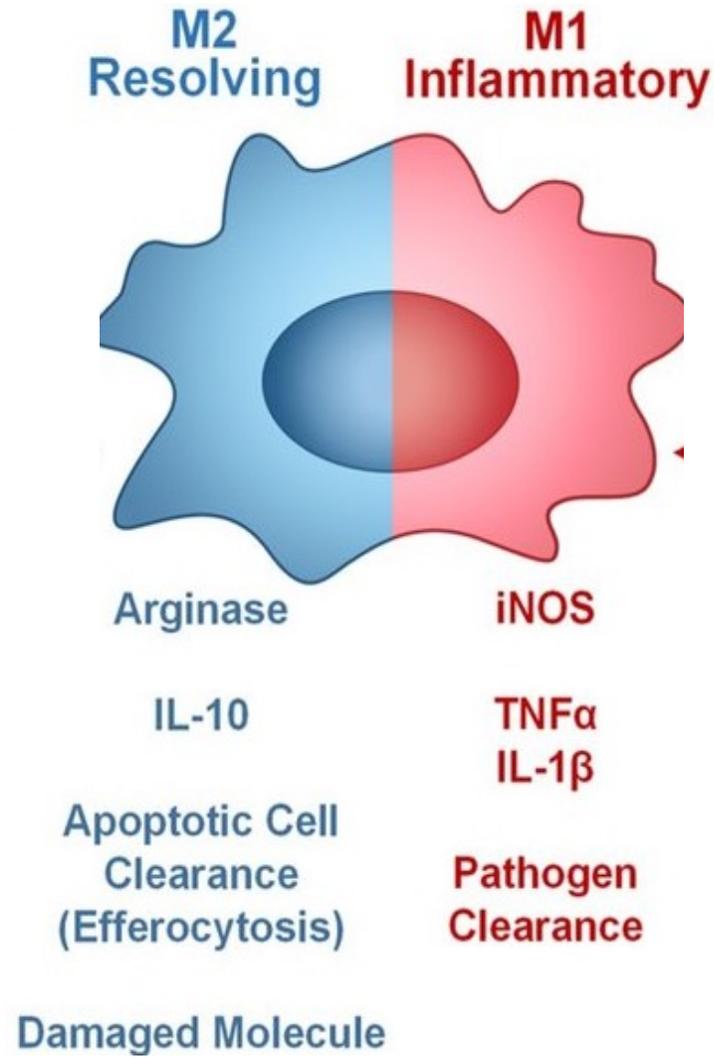
Macrofagi M1 e M2

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).

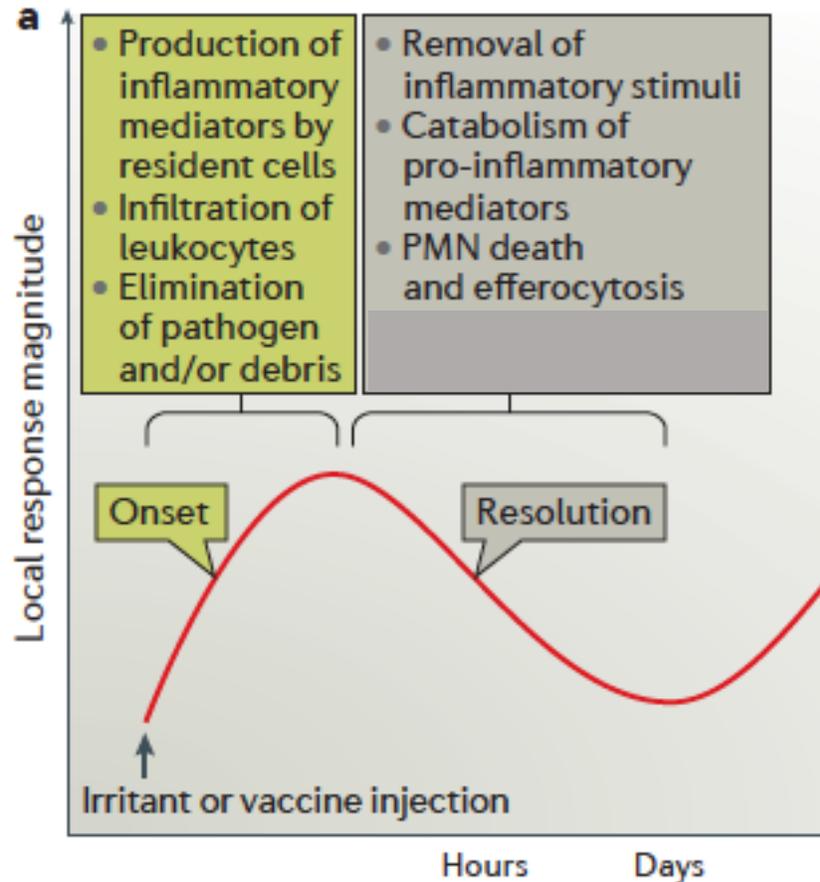
I macrofagi alternativamente attivati producono anche proteine ad attività immunoregolatoria quali: l'arginasi 1, l'IL-10. Per questo diversamente dai CAMs gli AAMs sono coinvolti nella soppressione della risposta immune e nella risoluzione della risposta infiammatoria.

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



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". 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-a, l'IL-6.

Risoluzione dell'inflammatione



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'inflammatione.
- 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 dal tessuto dei macrofagi derivati dai monociti

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

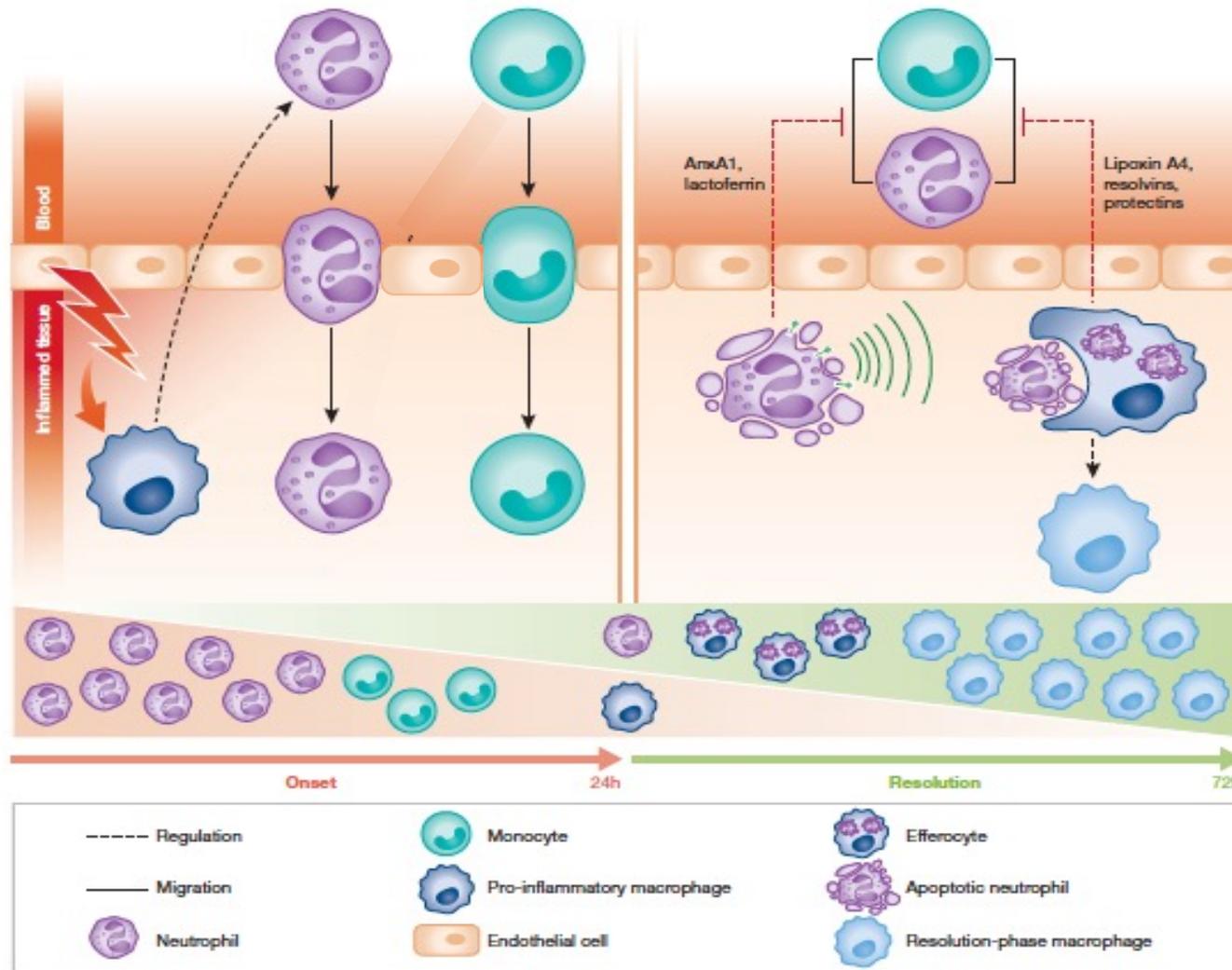


Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation. Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed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

Processi cellulari che caratterizzano l'esordio e la risoluzione dell'infiammazione:

Durante la fase iniziale del processo infiammatorio, le cellule residenti nel tessuto avvertono lo stimolo lesivo e producono citochine e chemochine che inducono la rapida fuoriuscita dai vasi sanguigni inizialmente dei neutrofili e successivamente dei monociti.

La risoluzione dell'infiammazione ha inizio quando i neutrofili diventano apoptotici e secernono mediatori che inibiscono l'infiltrazione dei neutrofili. L'ingestione dei neutrofili apoptotici da parte dei monociti modifica il fenotipo dei macrofagi che diventano macrofagi della fase di risoluzione e promuovono il ritorno del 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

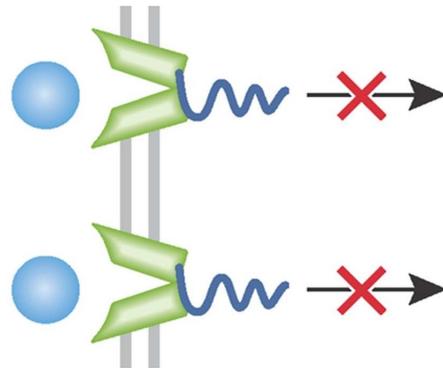
Chemokine truncation



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. Esempi di questi recettori sono DARC (Duffy antigen receptor for chemokines) e D6. DARC è espresso dalle cellule endoteliali.