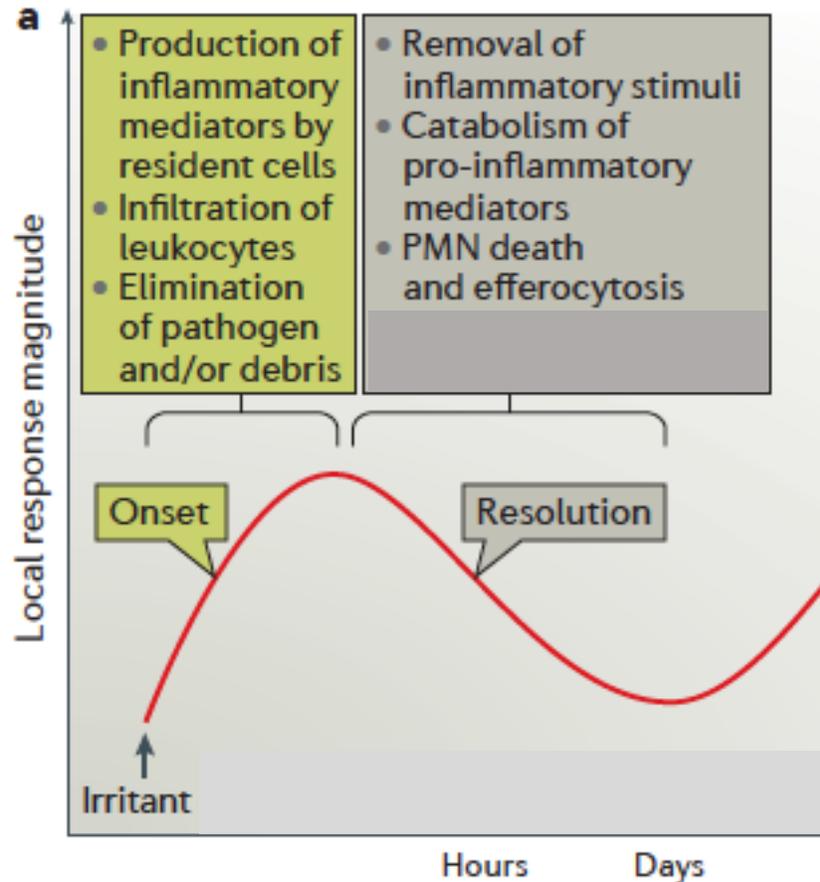


# Risoluzione dell'infiammazione

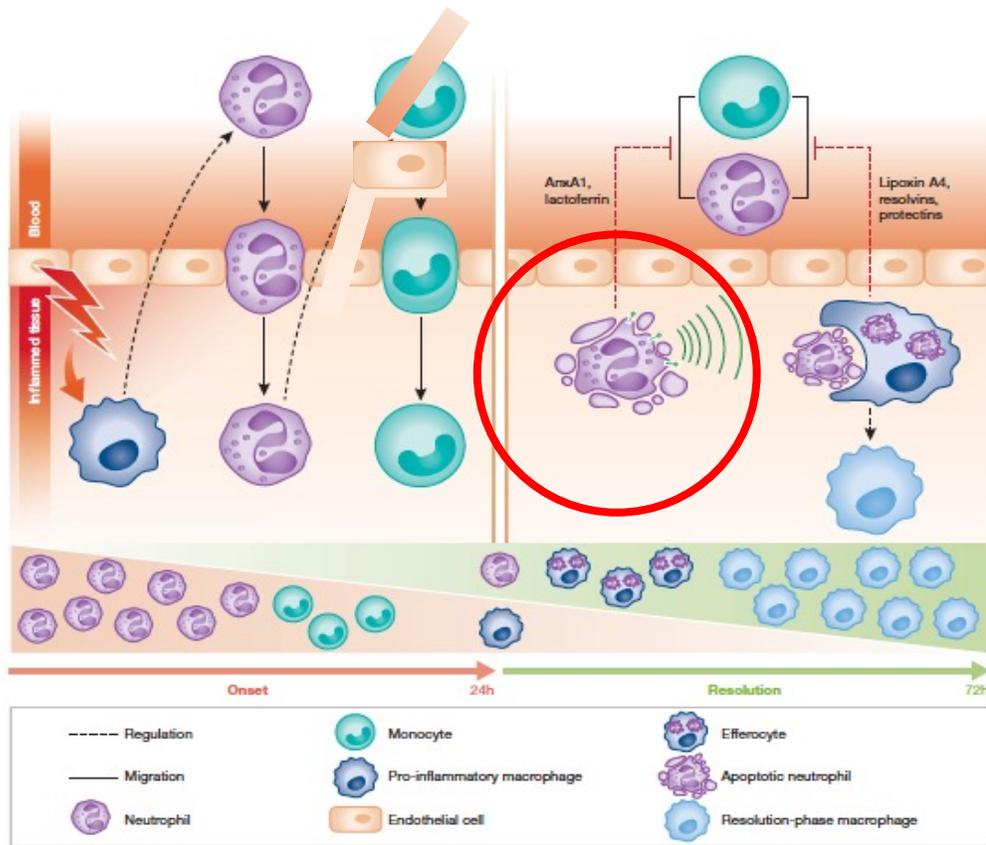


Il periodo fra il picco dell'influsso delle cellule infiammatorie nel sito lesivo e l'eliminazione di tali cellule fino al ripristino dell'equilibrio funzionale viene definito risoluzione.

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

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

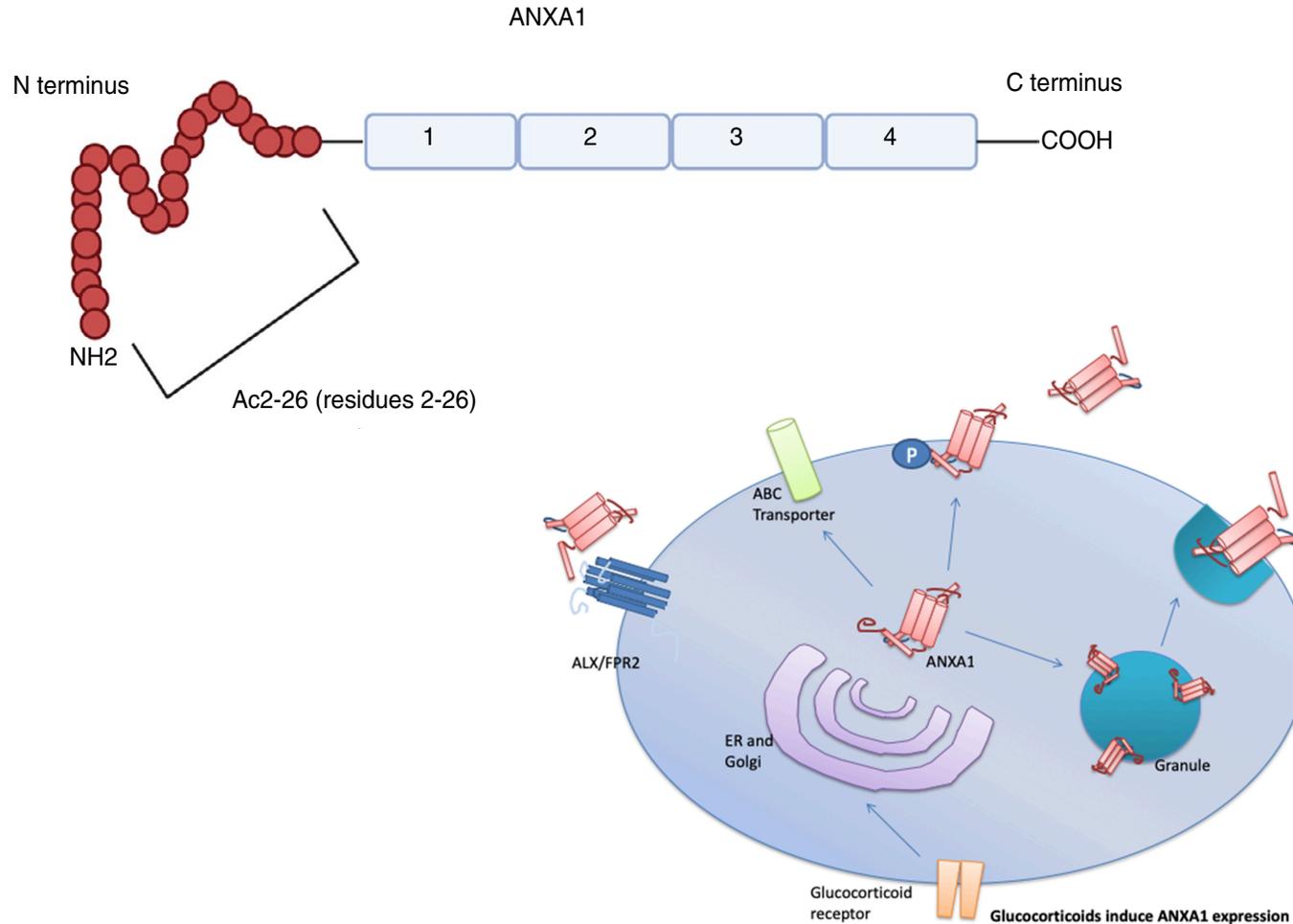


La risoluzione dell'infiammazione ha inizio quando i neutrofili diventano apoptotici.

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

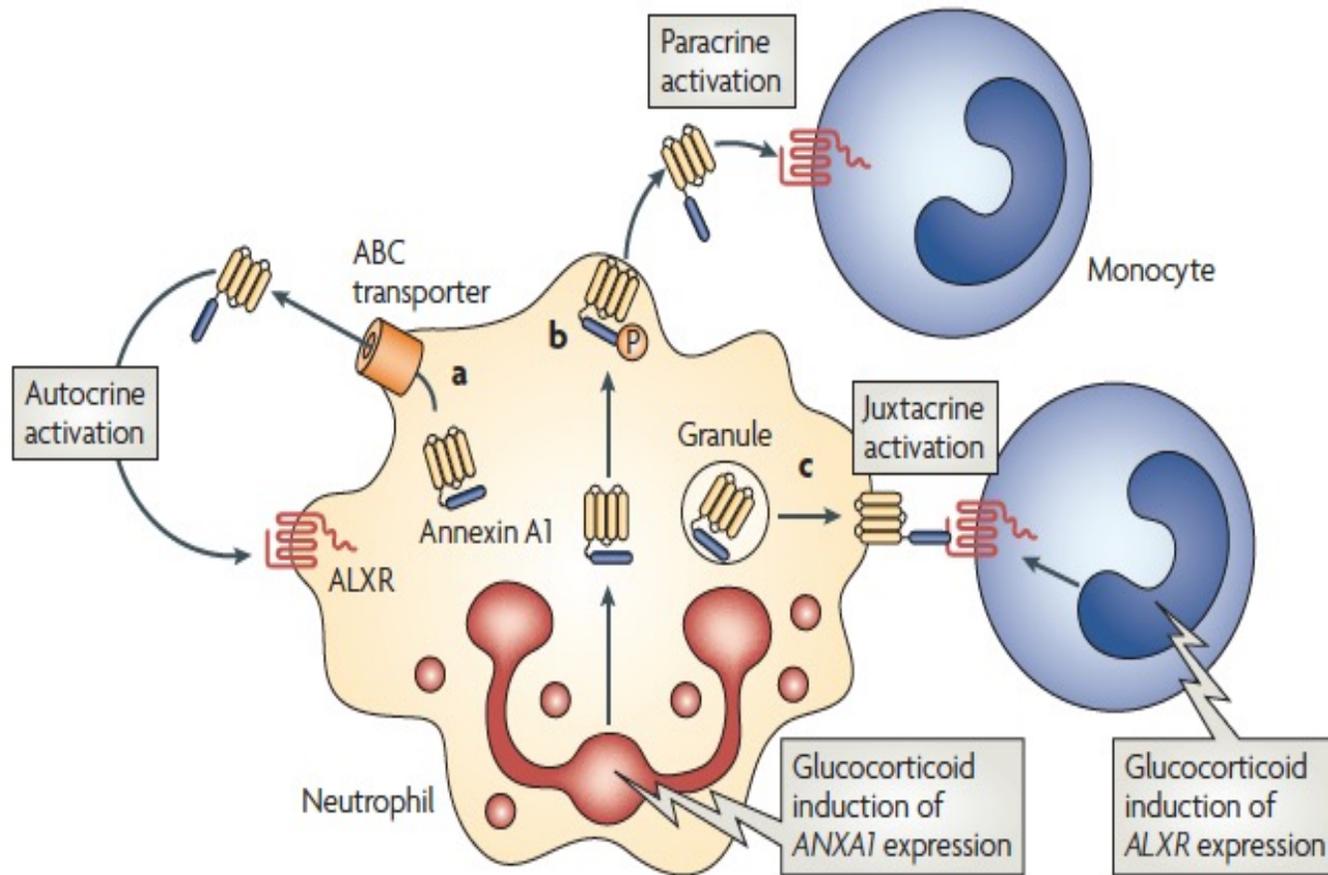


ANXA1 è composta da 4 domini che legano il  $\text{Ca}^{2+}$  e un dominio N-terminale. In presenza di calcio ANXA1 cambia la conformazione permettendo alla proteina di legare i fosfolipidi di membrana. L'esposizione della regione N-terminale permette l'interazione con il recettore FPR.

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.

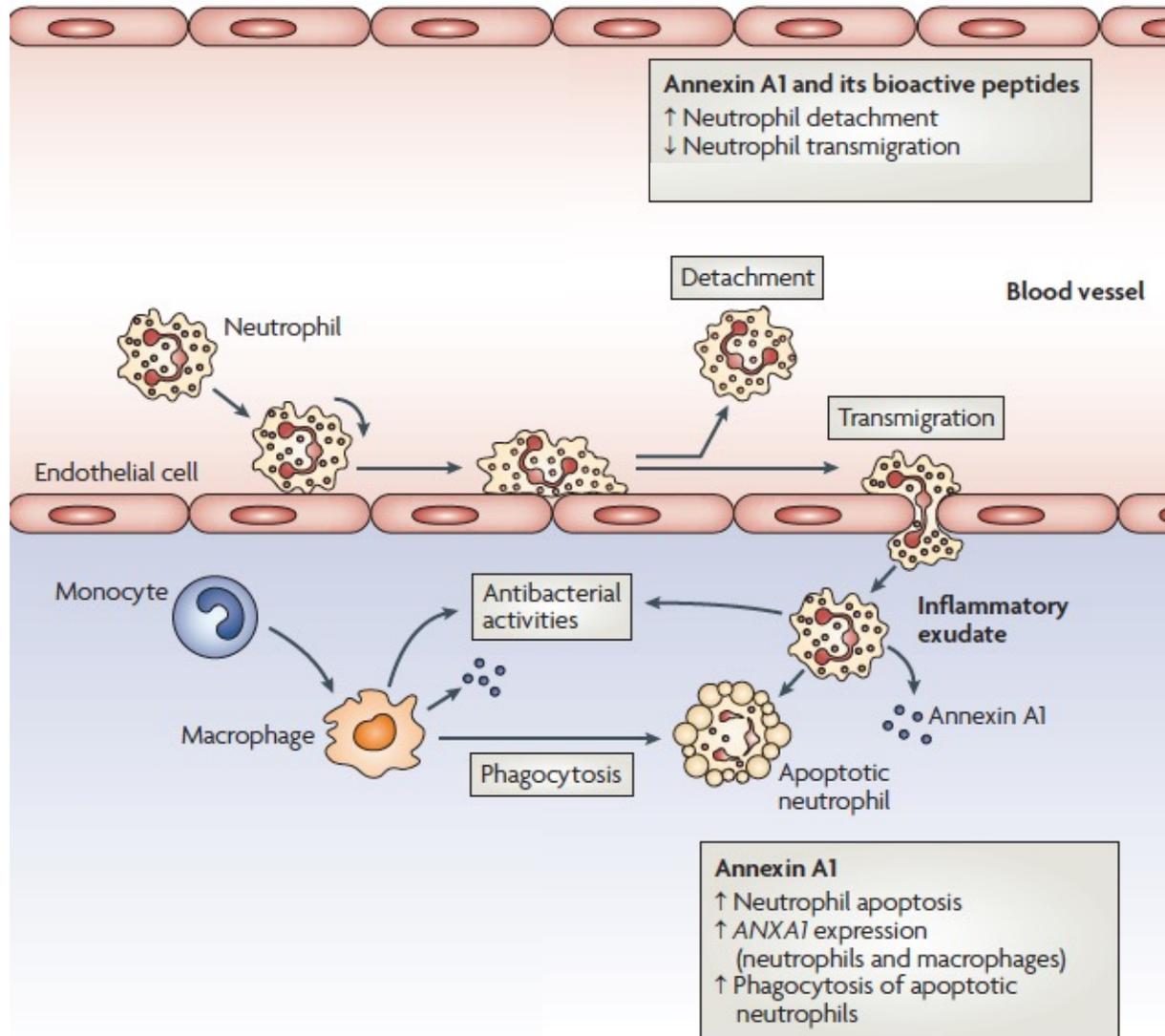
**FIGURE 1** | Upon cellular activation, ANXA1 is mobilized to the plasma membrane and then secreted in one of three mechanisms depending in the cell type involved. These mechanisms are: (1) through the ATP-binding (ABC) transporter; (2) via direct phosphorylation of ANXA1 on serine-27 followed by membrane 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.



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

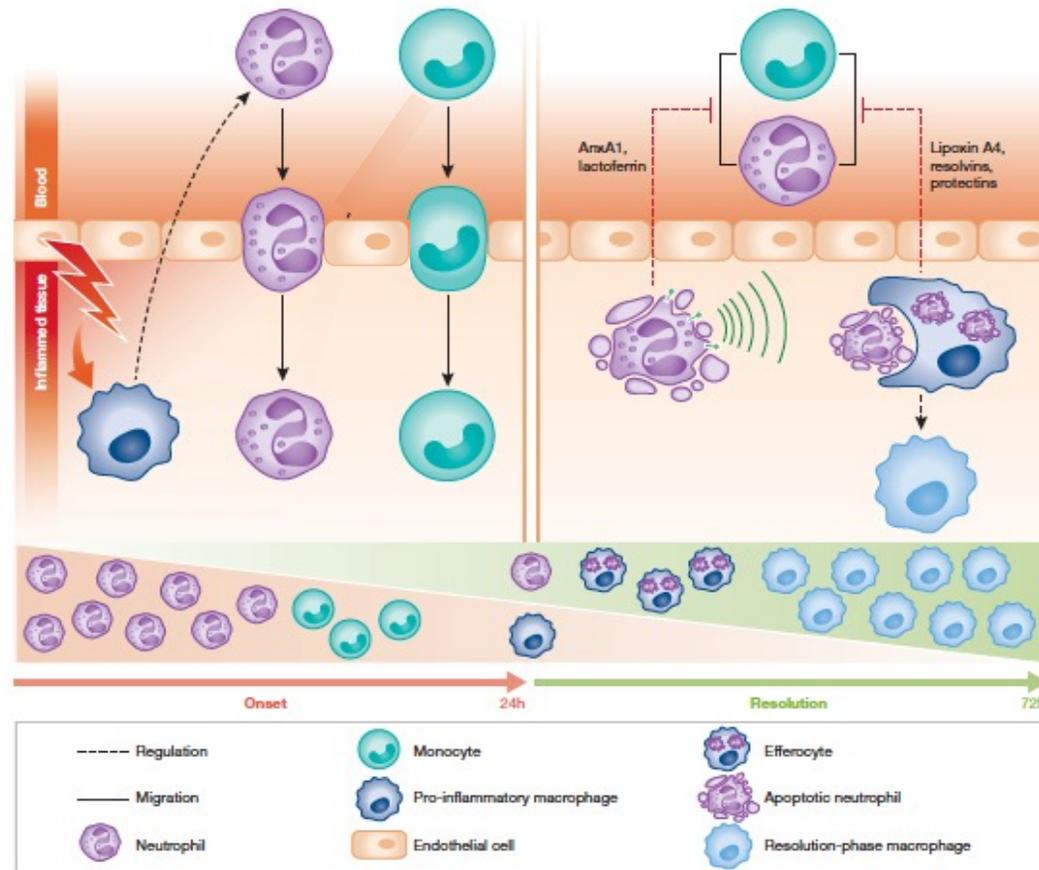
# Meccanismi di azione dell'Annexin A1



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

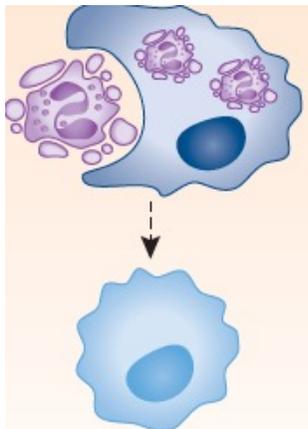
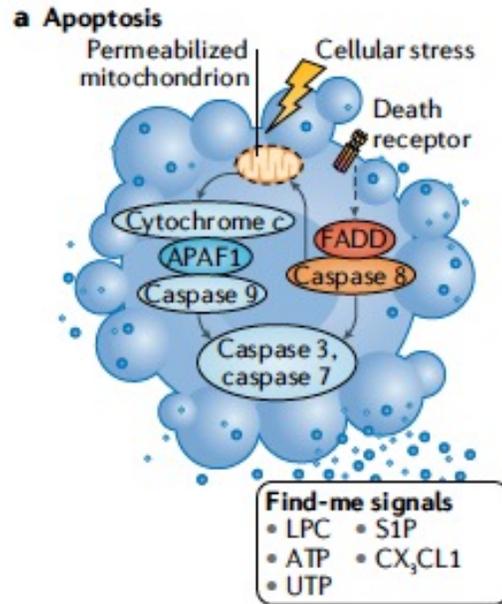
Aumenta la fagocitosi dei neutrofili da parte dei macrofagi

# L'apoptosi dei neutrofili è centrale nella risoluzione dell'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.

## L'efferocitosi dei neutrofili spegne l'infiammazione



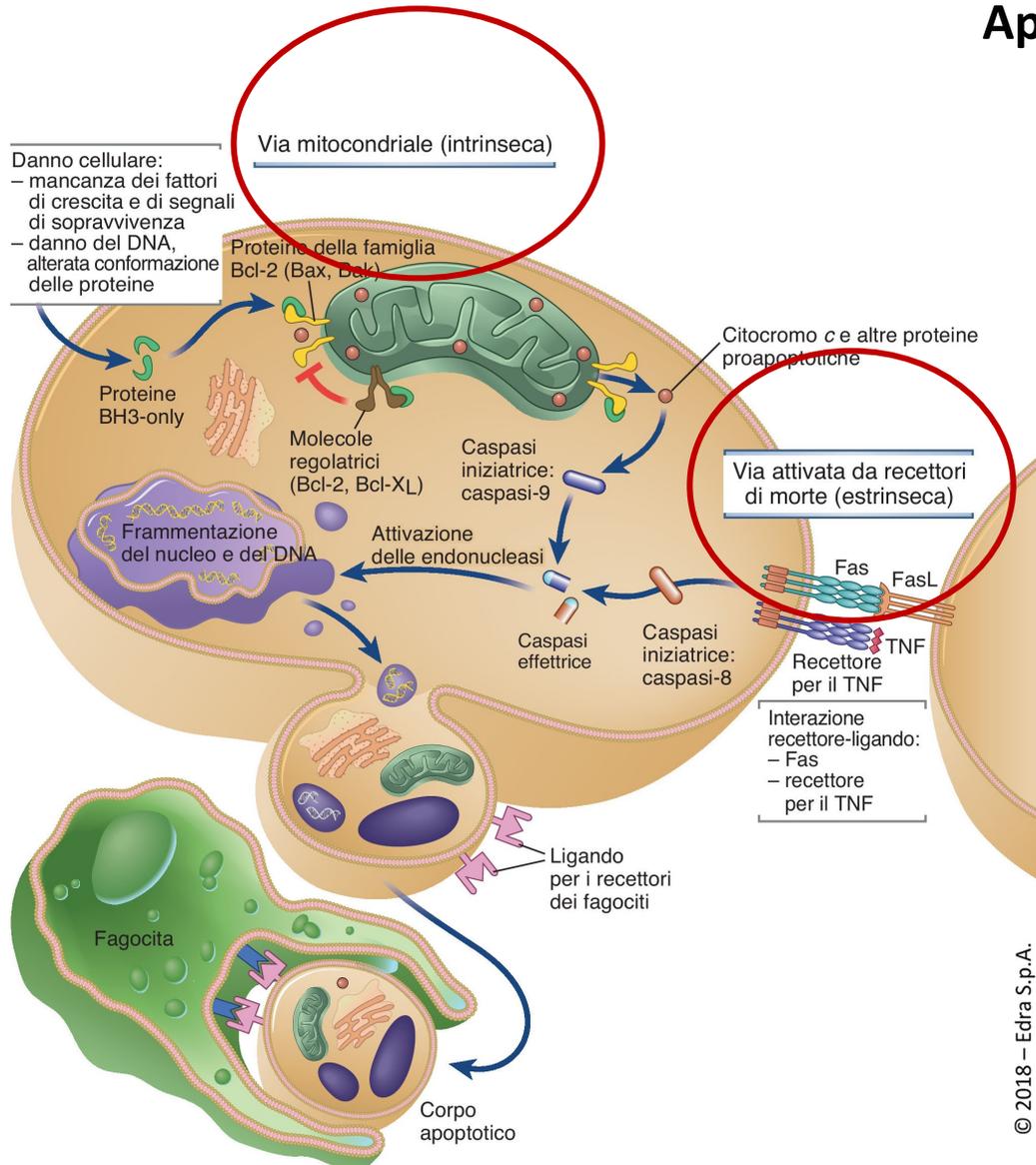
I neutrofili apoptotici sono eliminati dai macrofagi mediante l'efferocitosi (engulfment and clearance of dead and dying cells).

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- $\beta$ .

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



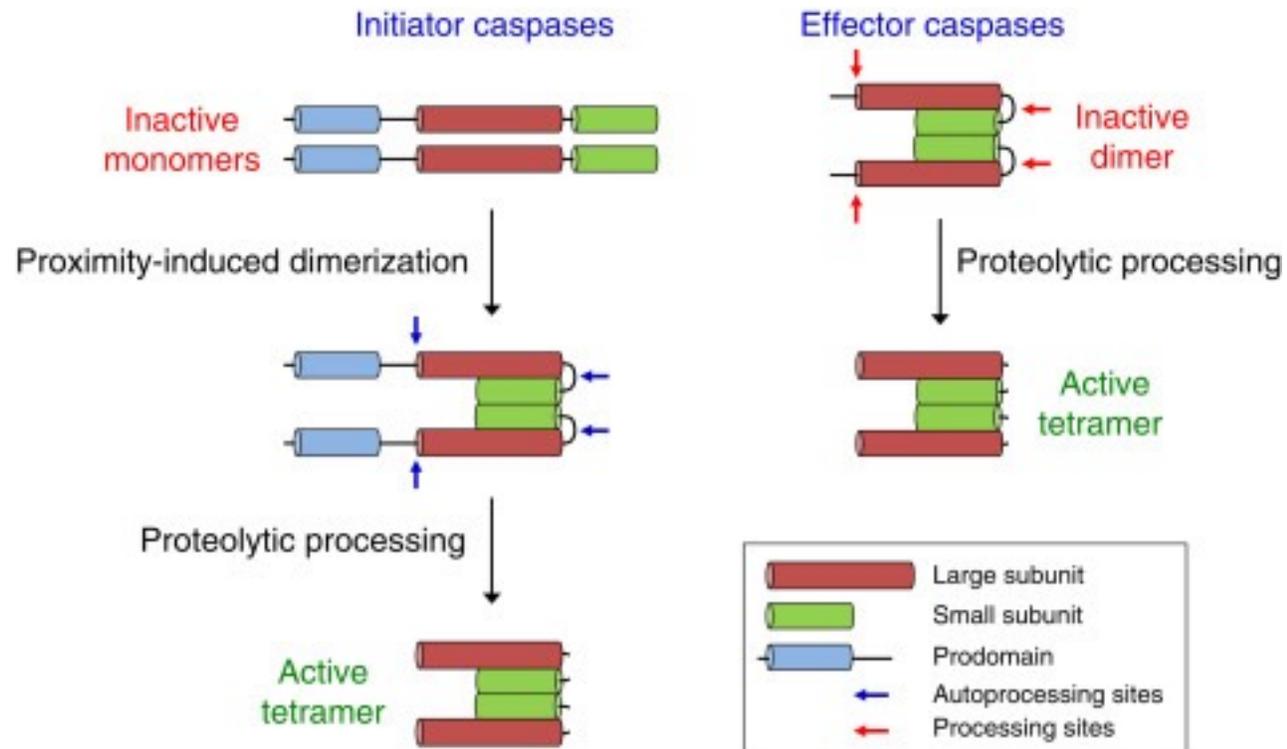
© 2018 - Edra S.p.A.

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

**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 proapoptotici 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



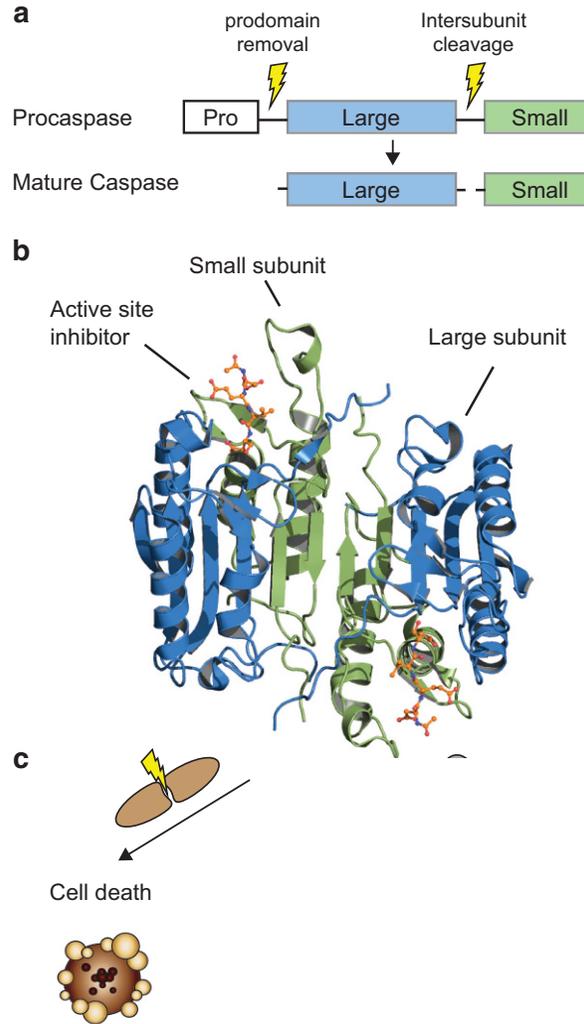
L'apoptosi è determinata dalla attivazione delle caspasi che sono proteasi contenenti cisteina nel loro sito attivo.

Le caspasi esistono come proenzimi inattivi che devono 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.

# Struttura delle caspasi

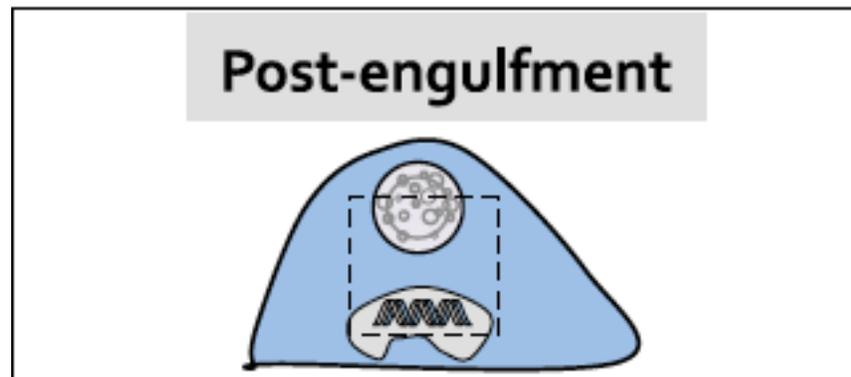
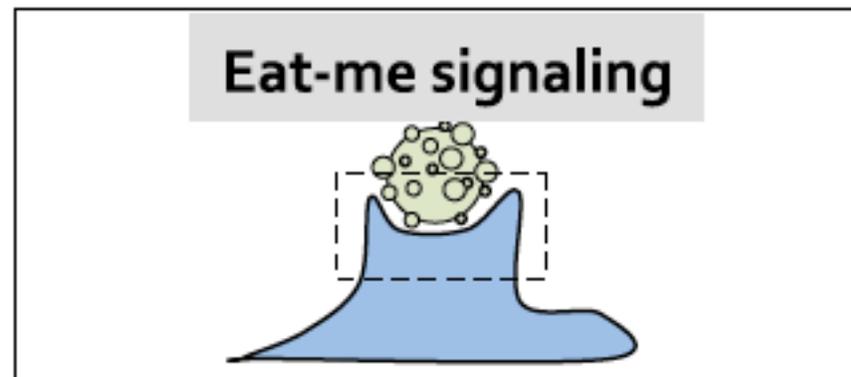
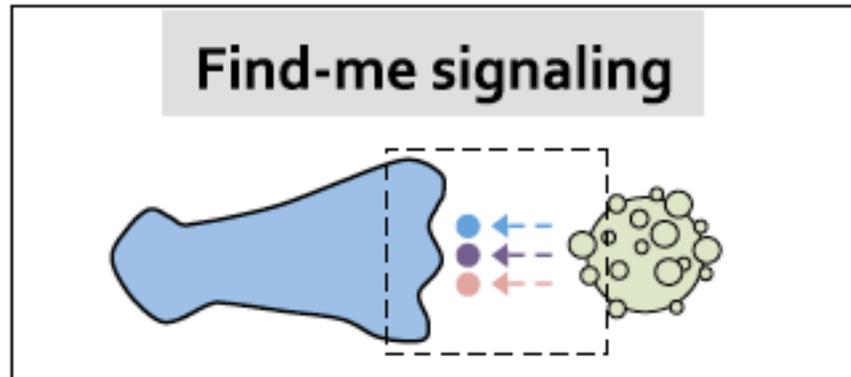


Le caspasi mature sono formate da un dimero di due molecole orientate testa coda ciascuna costituita da una subunità large e una subunità small contenenti un sito attivo.

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.

## Riconoscimento dei neutrofili in apoptosi

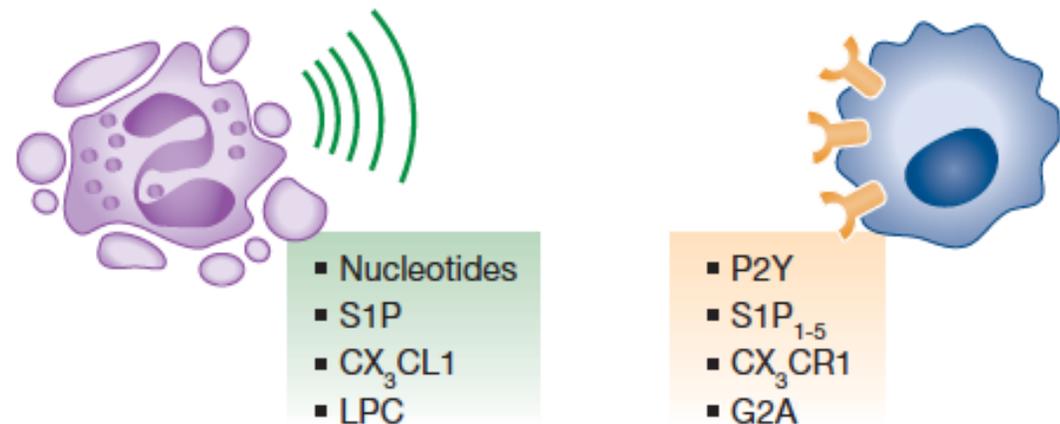


Durante l'apoptosi i neutrofili rilasciano segnali solubili nell'ambiente extracellulare che attirano i macrofagi e ne stimolano le capacità fagocitiche.

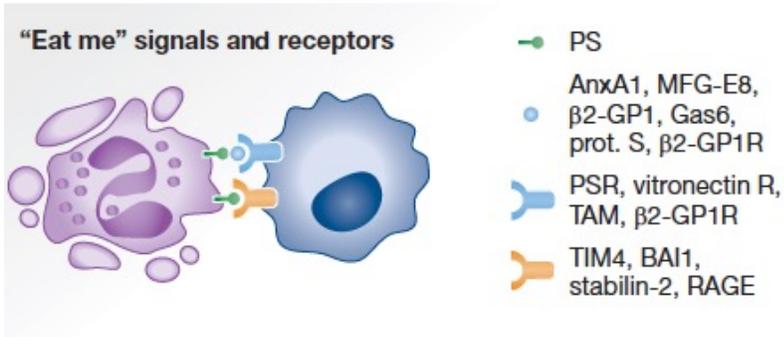
Questi segnali definiti «find me signals» includono:

- 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<sub>2</sub> che genera lisofosfatidil colina dalla fosfatidil colina. LPC è secreta dalla cellula mediante trasportatori. Queste molecole agiscono da fattori chemiotattici.

### “Find me” signals and receptors



## Segnali di riconoscimento dei neutrofili in apoptosi

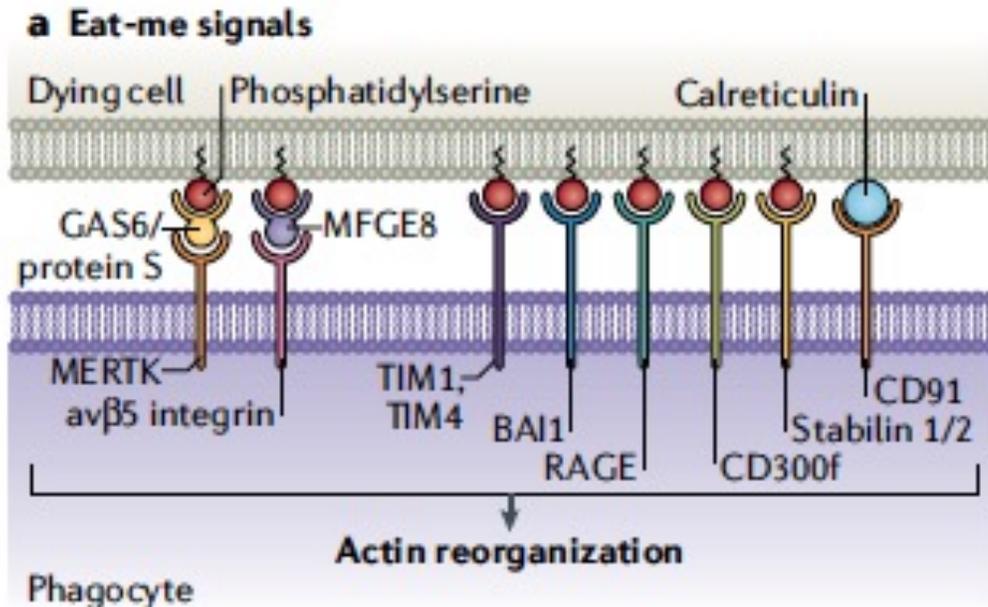


Le cellule morenti presentano sulla loro superficie segnali «eat me» che permettono ai macrofagi di discriminare le cellule in apoptosi da quelle sane.

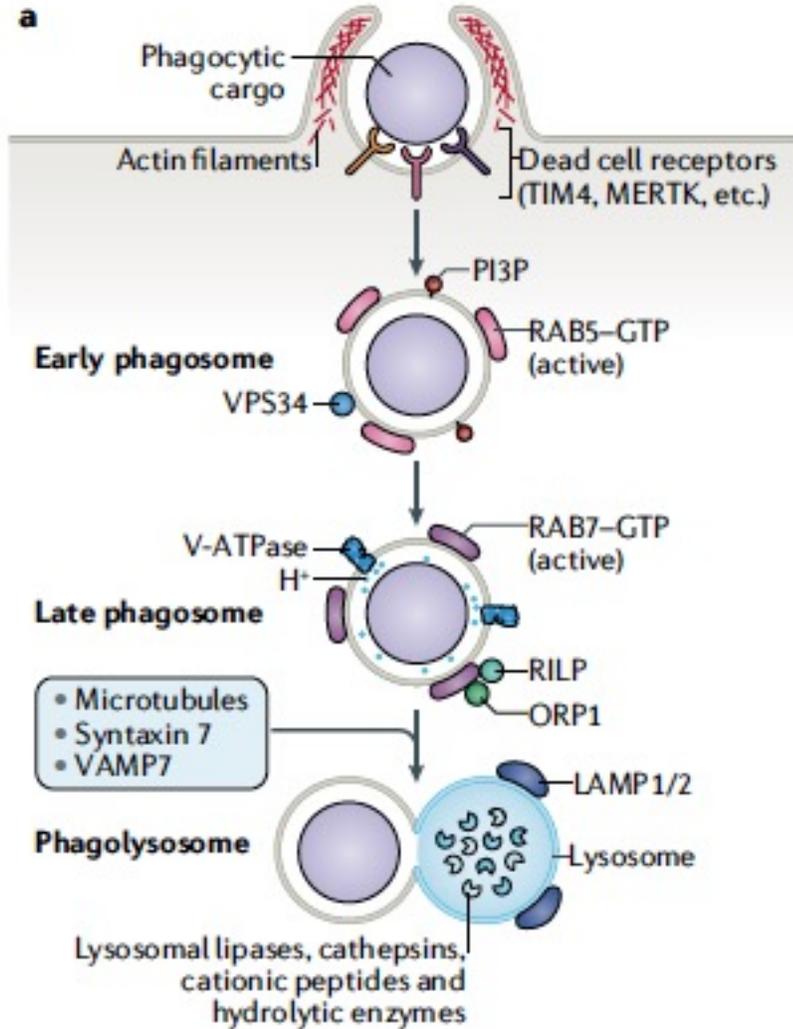
Le cellule morenti perdono l'asimmetria dei fosfolipidi di membrana (fosfatidil etanolamina e fosfatidil serina nello strato interno della membrana plasmatica) che è mediata dalla flippase ATP11 che confina la fosfatidilserina (PS) nello strato interno della membrana plasmatica e ne limita la mobilità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

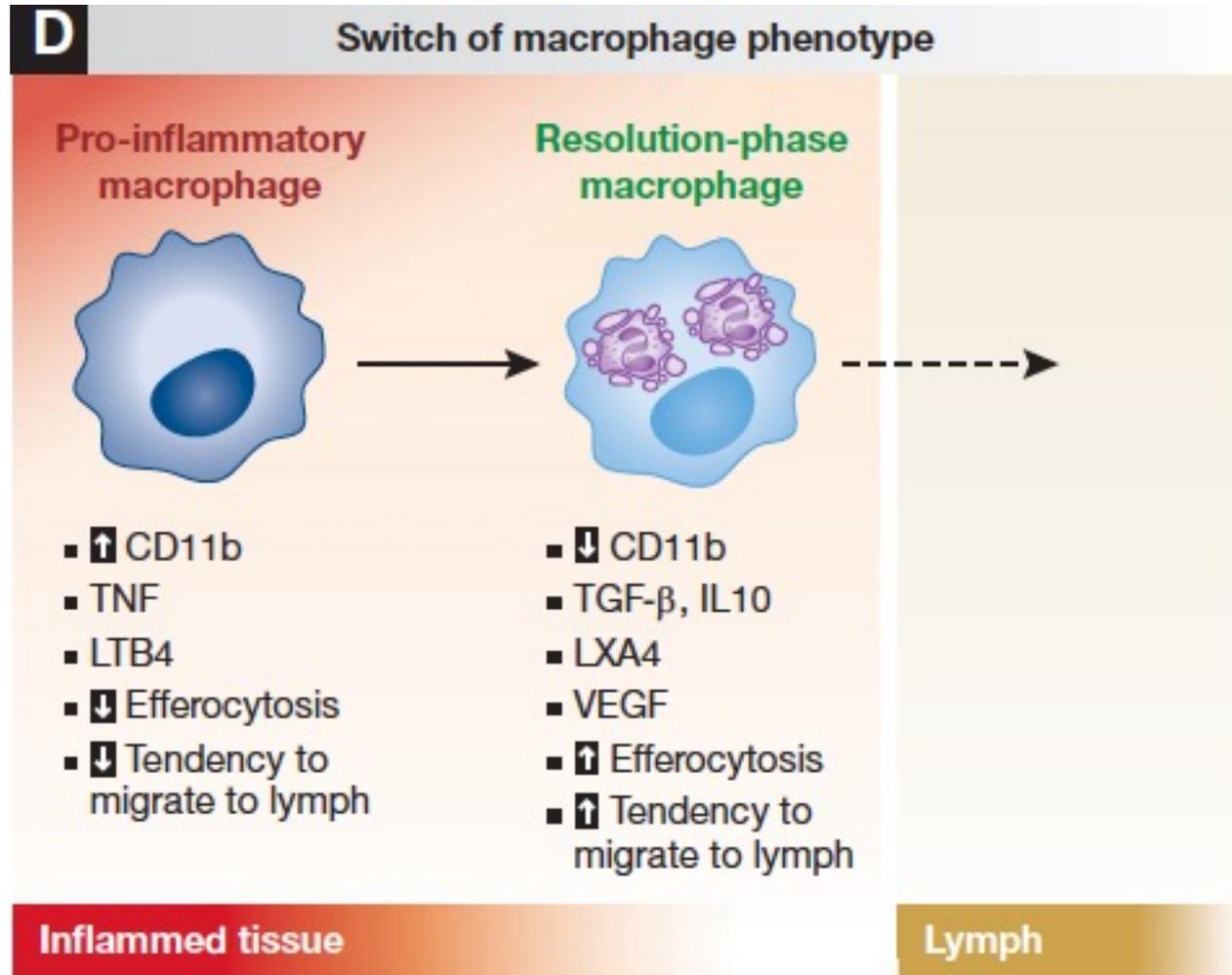


# Degradazione



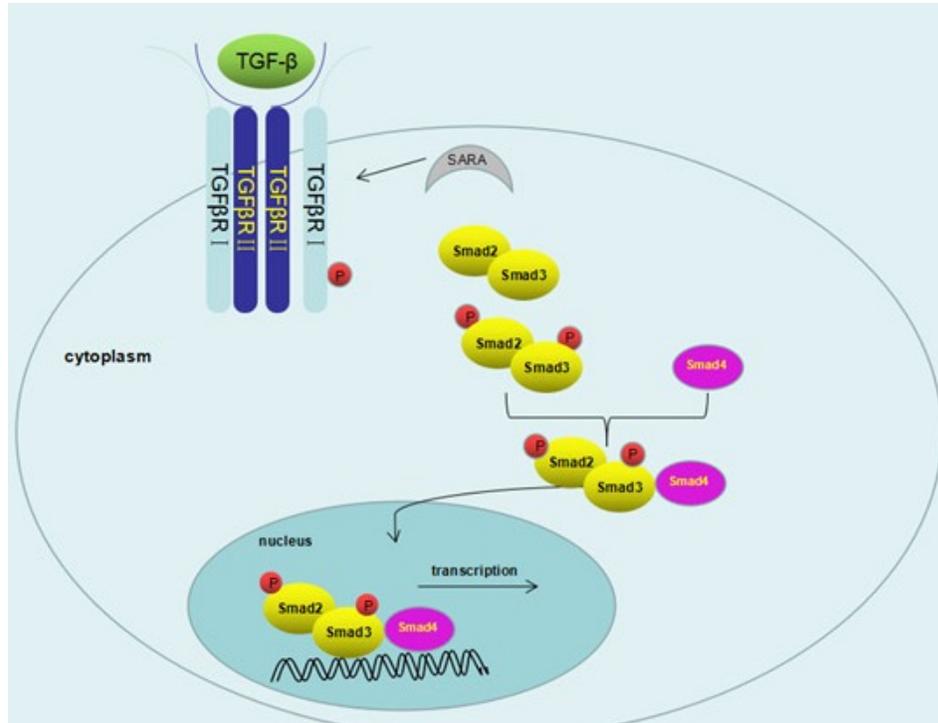
L'eliminazione dei corpi apoptotici da parte del fagocita avviene nel lisosoma e prevede la maturazione del fagosoma

# 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- $\beta$  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- $\beta$ e IL-10



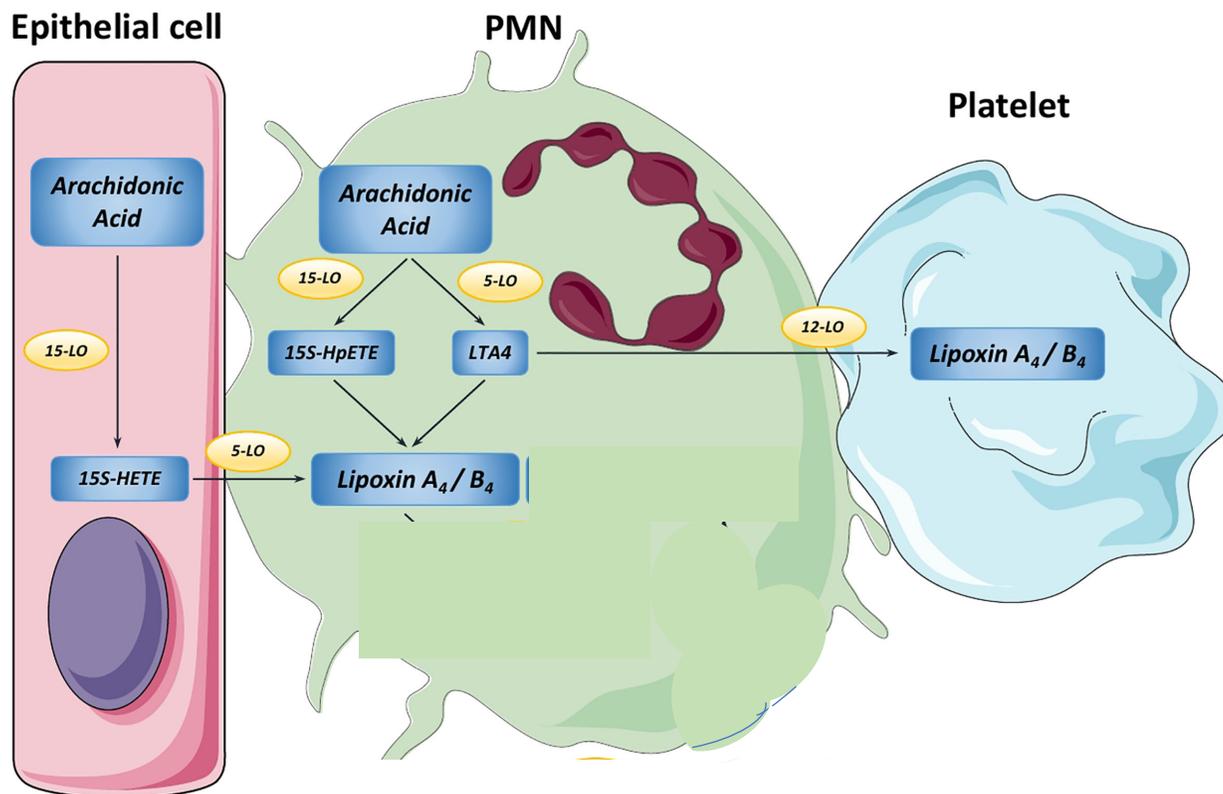
L'IL-10 inibisce l'attività dei macrofagi

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

## Il TGF- $\beta$ 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'inflammazione



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).

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

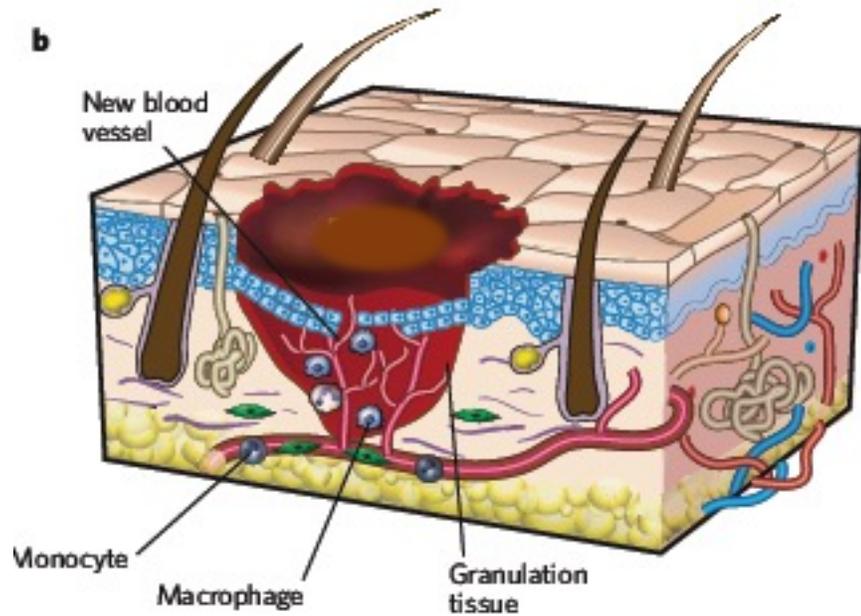
Le lipossine sono derivati dell'acido arachidonico e possono essere prodotte dai neutrofili nel sito infiammato attraverso 2 vie.

- L'acido arachidonico è convertito in 15(S)-HpETE (acido idroperossieicosatetraenoico) da parte della 15-lipossigenasi e successivamente sono prodotte le lipossine A<sub>4</sub>/B<sub>4</sub>.
- L'acido arachidonico è convertito in LTA<sub>4</sub> (leucotriene A<sub>4</sub>) da parte della 5-lipossigenasi e successivamente sono prodotte le lipossine

Le lipossine:

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

## Riparazione



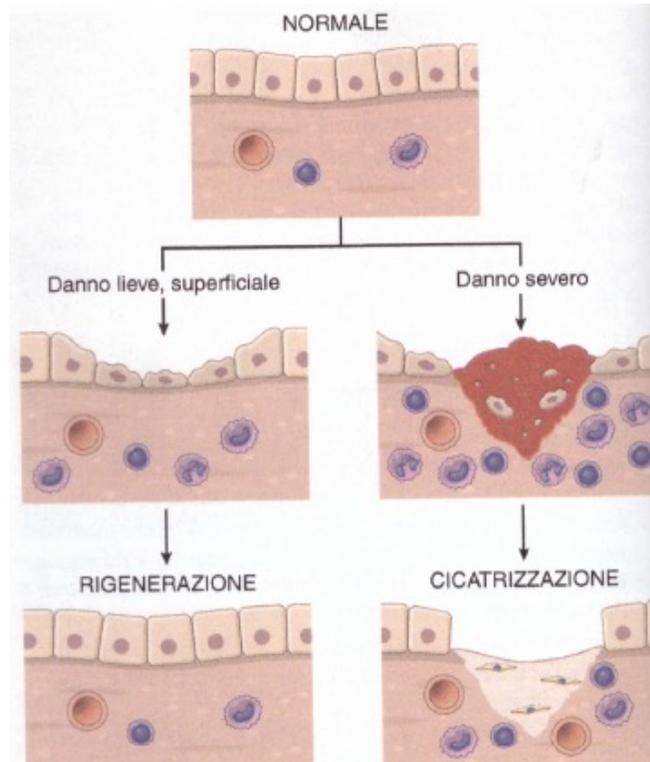
La risposta infiammatoria agli agenti lesivi serve non solo per eliminarli ma anche per avviare la riparazione tissutale.

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. 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

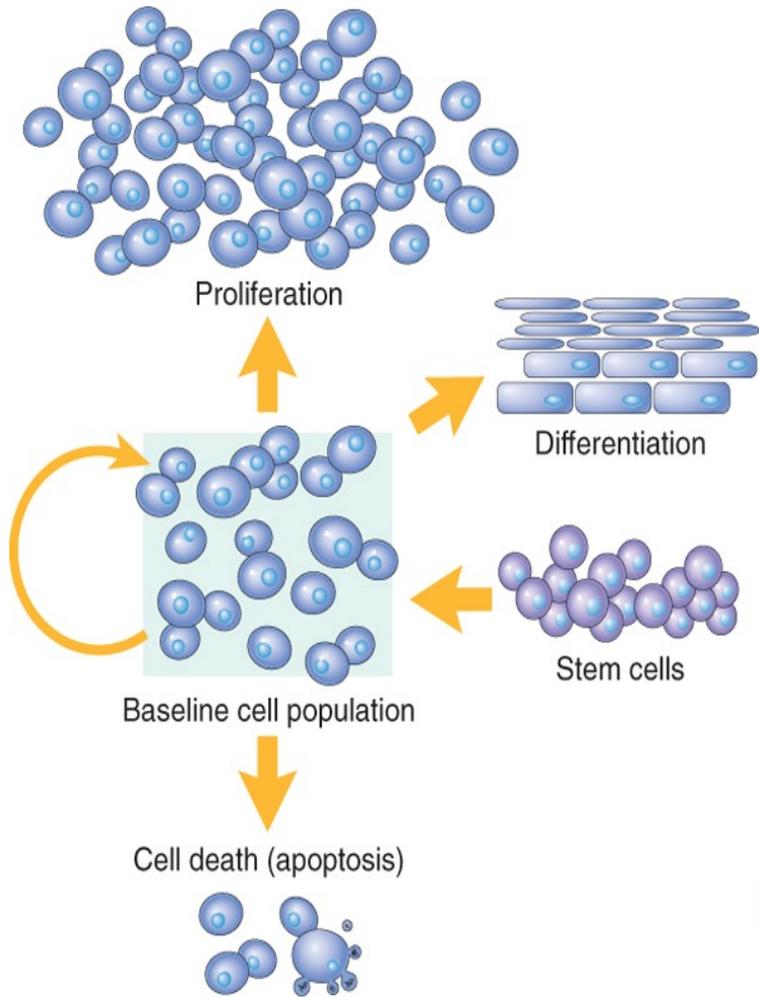
La capacità dei tessuti di riparare è influenzata dalla capacità proliferativa intrinseca, i tessuti possono essere distinti in:

**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 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.

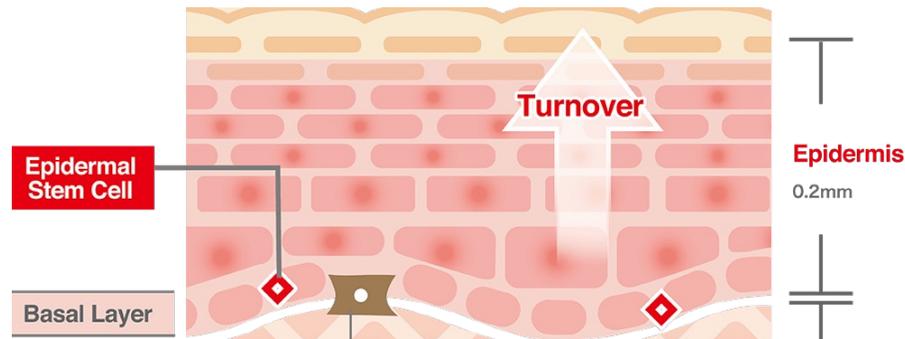
**Tessuti perenni:** le cellule di questi tessuti sono considerate incapaci di proliferare. La maggior parte dei neuroni e delle cellule del muscolo cardiaco appartengono a questa categoria. Fatta eccezione per i tessuti composti da cellule perenni, la maggior parte dei tessuti maturi contiene percentuali 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



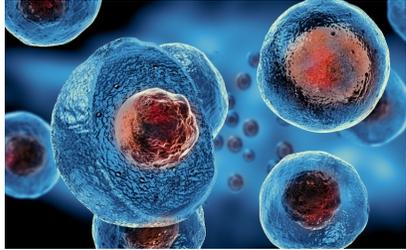
© Elsevier. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8e - www.studentconsult.com

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.

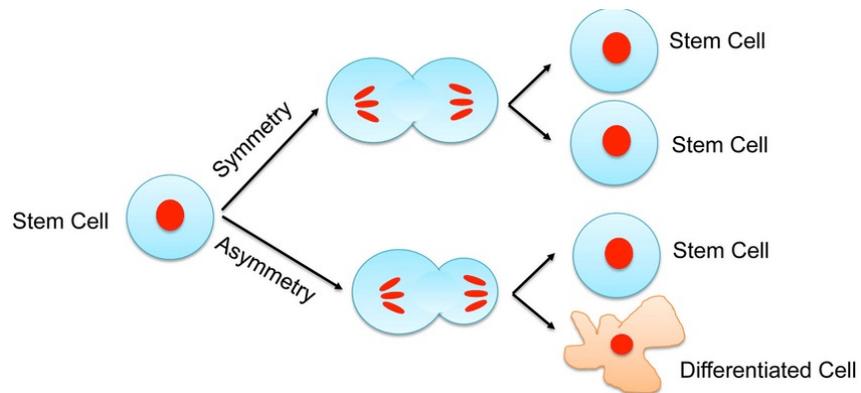
## Le cellule staminali



Le cellule staminali sono caratterizzate da:

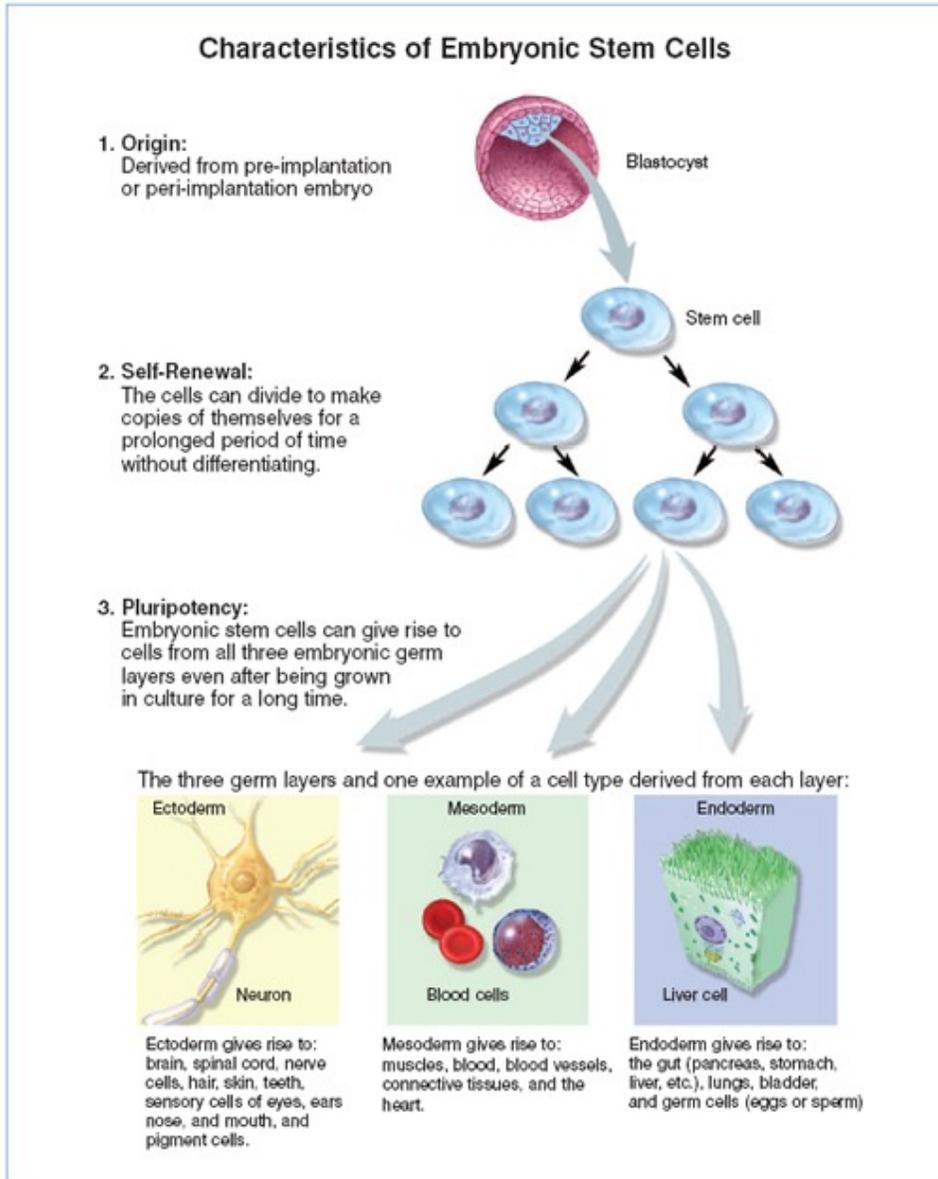
- i) capacità di autorinnovarsi
- ii) replicazione asimmetrica

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



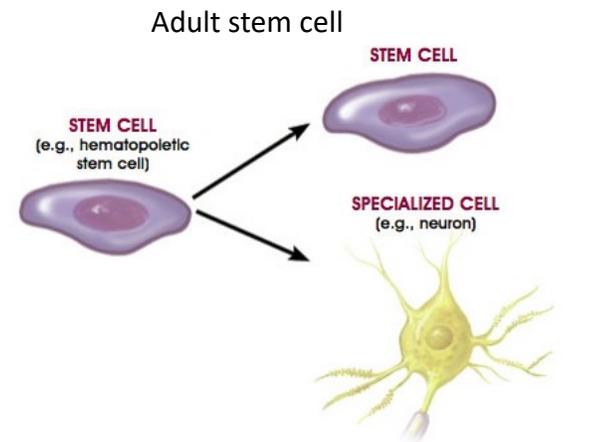
Le cellule staminali vanno incontro a divisione simmetrica o asimmetrica. Quando una cellula staminale va incontro a divisione simmetrica, questa dà origine a due cellule identiche alla cellula madre. Nella divisione asimmetrica la cellula staminale che si divide dà origine a una cellula che è identica 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

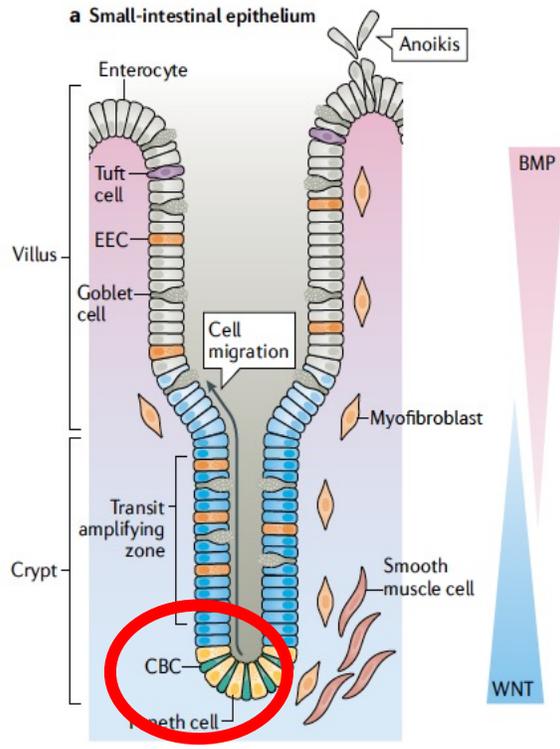
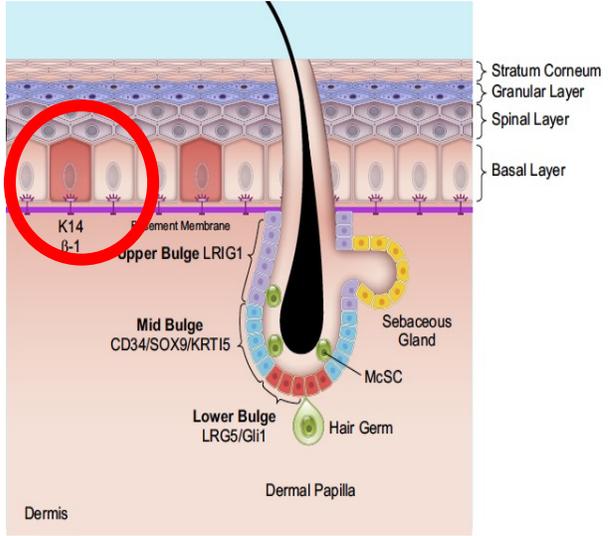


Le cellule staminali embrionali (ES) sono presenti all'interno della blastocisti e hanno una grande capacità di autorinnovamento. In appropriate condizioni di coltura possono dare origine a cellule che derivano da tutti e tre i foglietti embrionali. Le ES danno origine alle cellule di tutto il corpo.

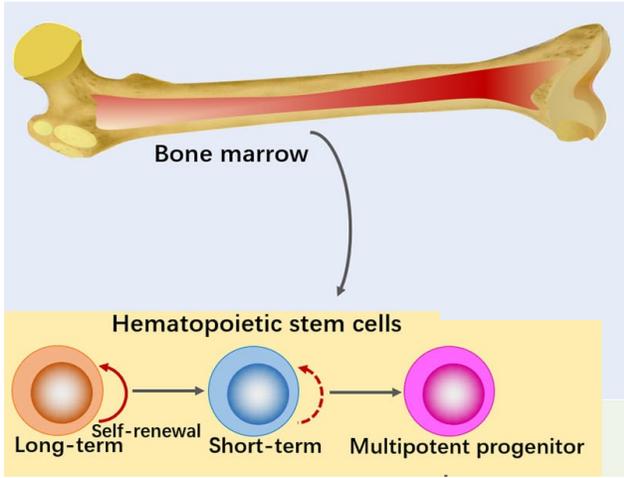
Le cellule staminali adulte si trovano fra le cellule differenziate all'interno di un tessuto e hanno un potenziale di differenziazione più ristretto.



# 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.

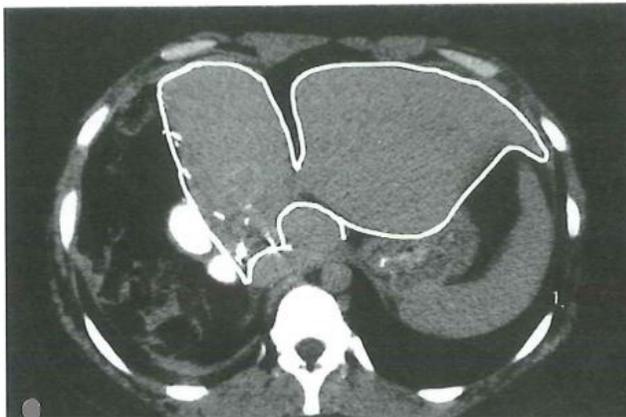
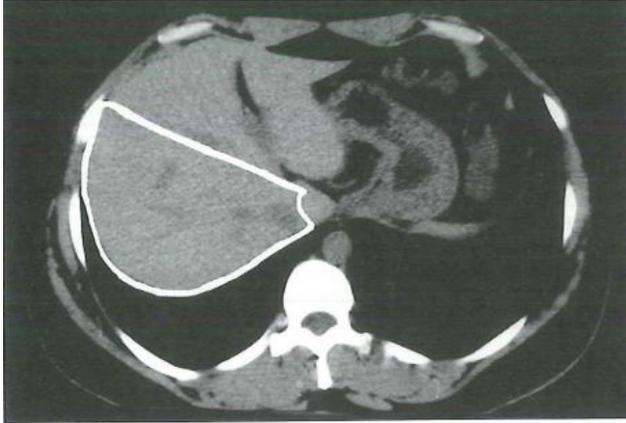
Si localizzano nelle nicchie delle cellule staminali e segnali provenienti da altre cellule le mantengono quiescenti.

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.

## Rigenerazione epatica



Rigenerazione del fegato umano. TC (Tomografia assiale computerizzata) che mostra in alto il lobo destro del donatore. In basso TC del fegato del donatore dopo 1 settimana.

Molti dei processi che sono definiti rigenerativi negli organi dei mammiferi sono fenomeni di **crescita compensatoria** che comportano ipertrofia e iperplasia (aumento del volume dell'organo dovuto a proliferazione cellulare). Questi ripristinano la capacità funzionale dell'organo senza ripristinare l'originale anatomia.

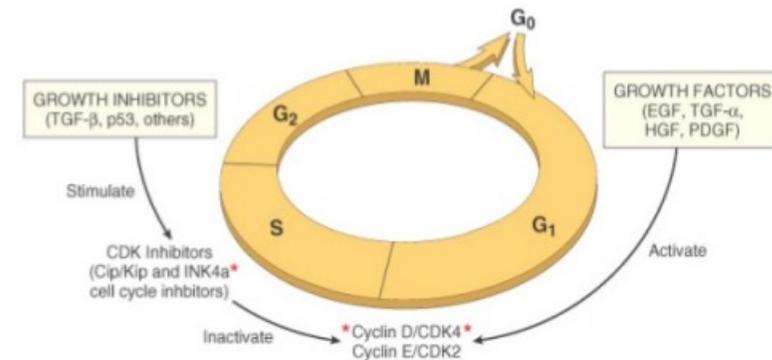
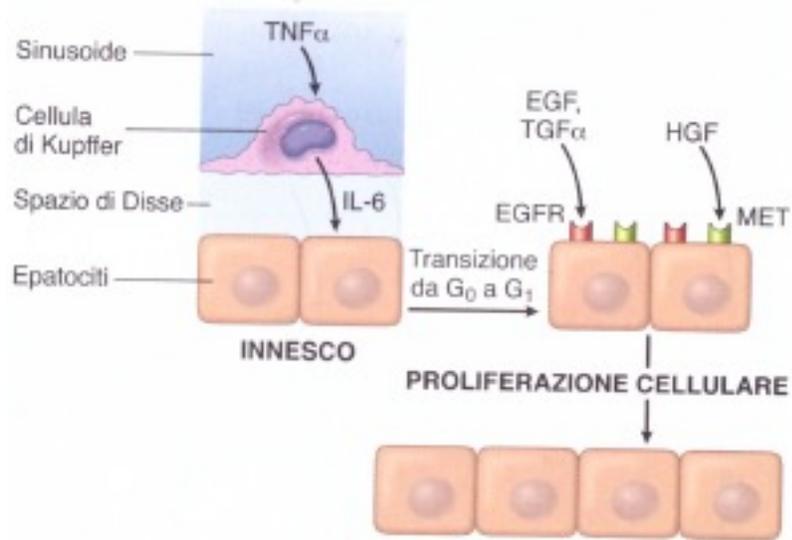
Il fegato umano dopo epatectomia parziale va incontro a ricrescita dei lobi che non sono stati interessati dall'intervento. Questo processo prende il nome di crescita compensatoria.

La proliferazione degli epatociti è dovuta all'azione di citochine e fattori di crescita.

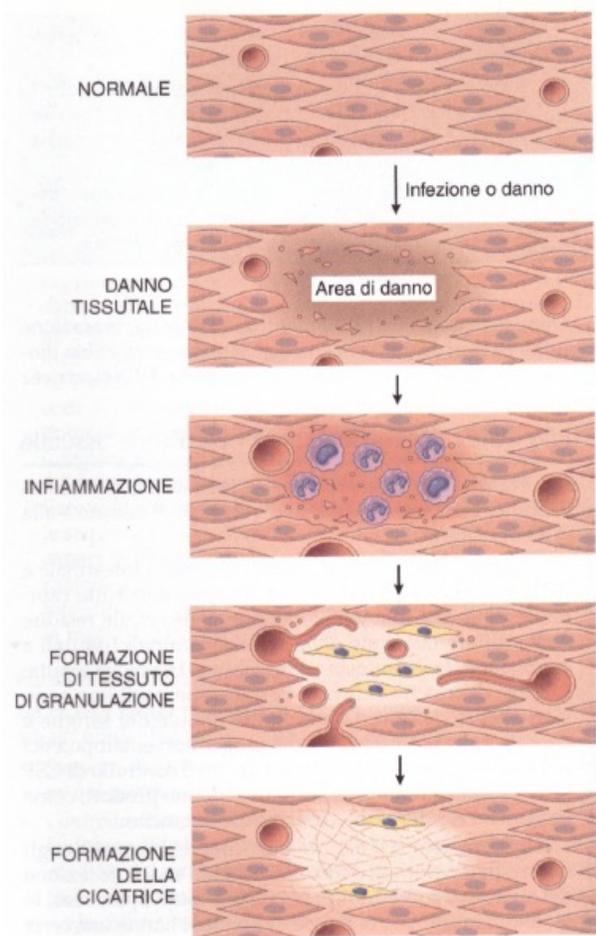
L'entrata degli epatociti nel ciclo cellulare è mediata dall'IL-6 e dal TNF- $\alpha$  e l'avanzamento del ciclo cellulare dipende dall'HGF (hepatocyte growth factor).

## Rigenerazione del fegato

Nell'uomo la resezione fino al 90% del fegato può essere compensata dalla proliferazione degli epatociti rimanenti. La proliferazione degli epatociti viene attivata dall'azione congiunta di citochine come l'IL-6 e fattori di crescita. L'IL-6 prodotta dalle cellule di Kupffer prepara gli epatociti a rispondere ai fattori di crescita come il fattore di crescita degli epatociti (HGF) prodotto dalle cellule del Kupffer o dalle cellule endoteliali, il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita trasformante (TGF- $\alpha$ ) che ne promuovono la proliferazione.



# Cicatrizzazione

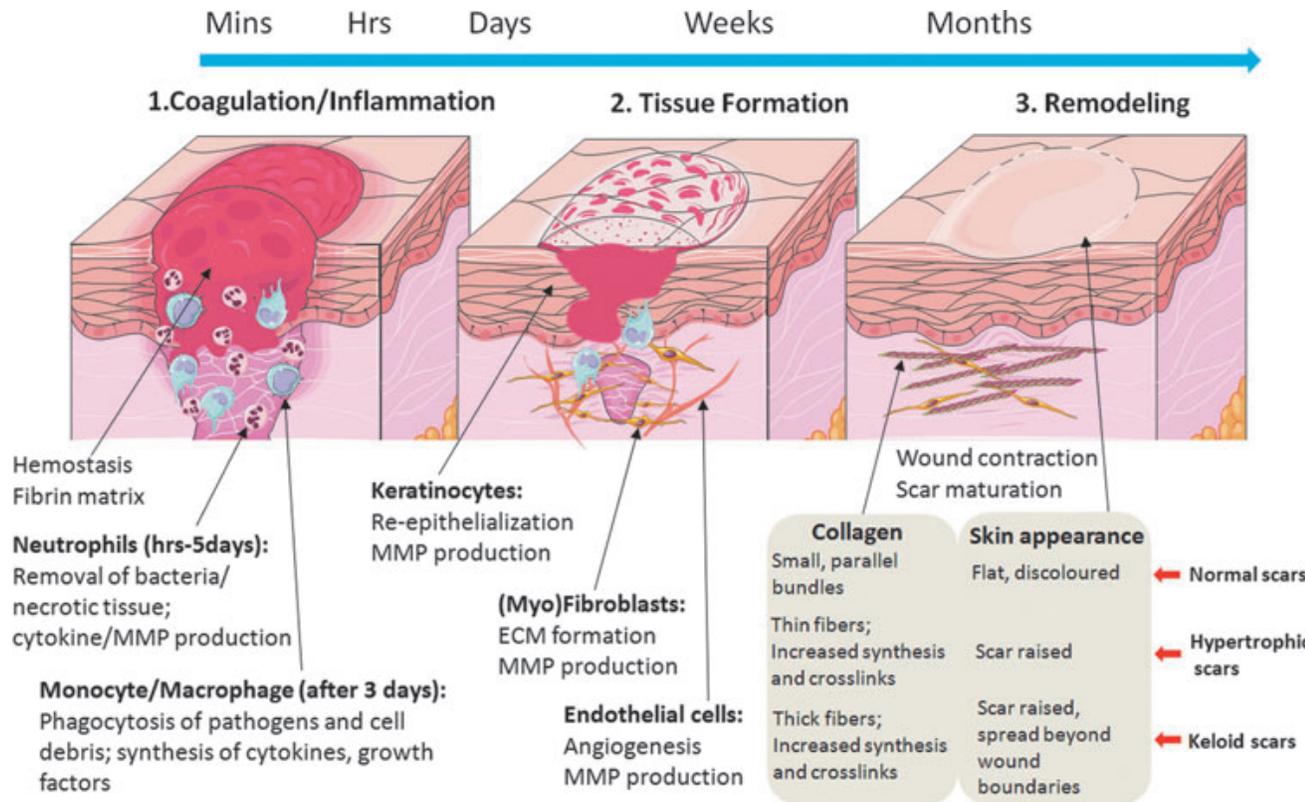


Se l'insulto ad un tessuto non solo danneggia le cellule parenchimali o epiteliali ma anche il tessuto connettivo oppure se vengono danneggiate cellule che hanno perso la capacità di dividersi la riparazione avviene o attraverso la sostituzione delle cellule danneggiate con tessuto connettivo con formazione di una cicatrice o con una combinazione di rigenerazione parziale e cicatrizzazione.

# Riparo delle ferite

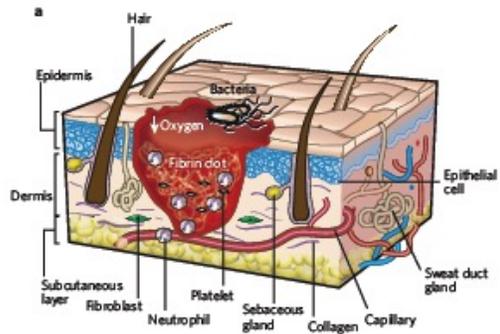
Il riparo delle ferite è un processo dinamico e altamente regolato che interessa diversi tipi di cellule (cellule epiteliali, cellule endoteliali macrofagi e fibroblasti), citochine e fattori di crescita. Nel riparo delle ferite cutanee si distinguono tre fasi che includono:

- la coagulazione/risposta infiammatoria
- formazione di nuovo tessuto
- rimodellamento del tessuto

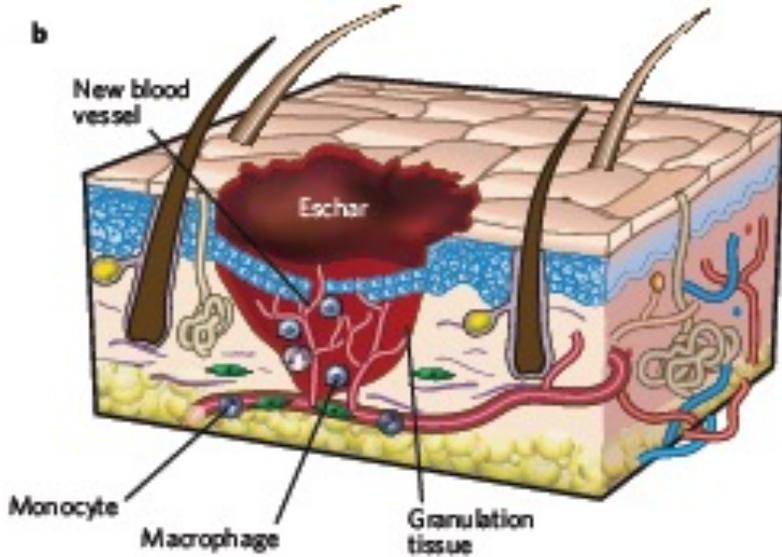


La prima fase del riparo delle ferite è dedicata all'arresto del sanguinamento (emostasi). In risposta al danno dei vasi sanguigni viene avviata la coagulazione. Il coagulo oltre che da piastrine è costituito da fibrina, fibronectina e vitronectina che formano una matrice che sostiene la migrazione dei leucociti, dei fibroblasti, delle cellule endoteliali e dei cheratinociti e presenta diversi fattori di crescita.

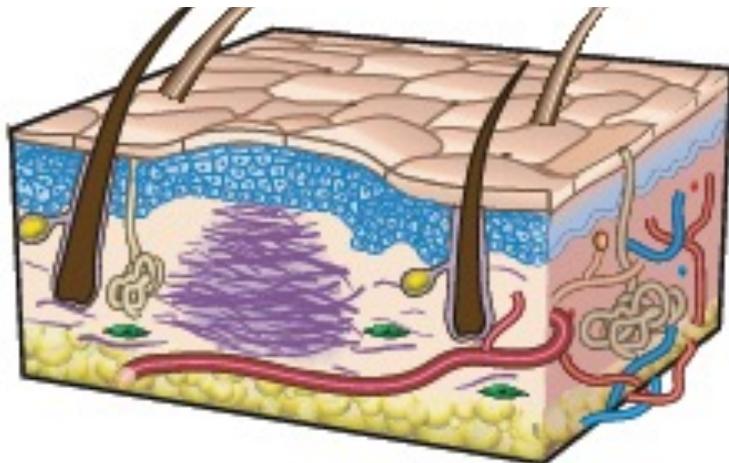
## Riparo della ferita: formazione di nuovo tessuto



Infiammazione



Formazione di nuovo tessuto



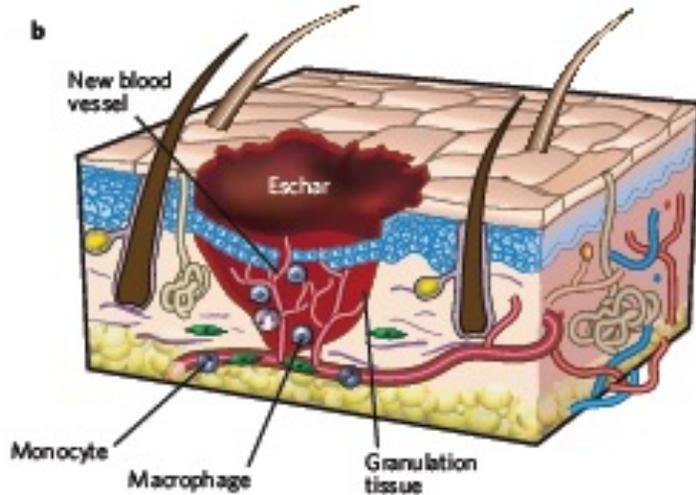
Rimodellamento

La fase di formazione del nuovo tessuto (3-10 giorni dopo la ferita) ha l'obiettivo di coprire la superficie della ferita, di formare il tessuto di granulazione.

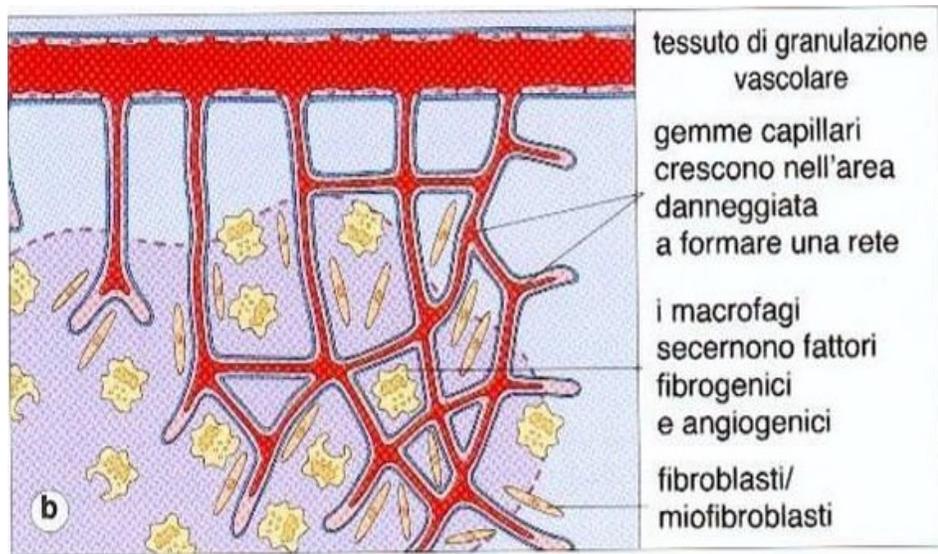
La formazione di nuovo tessuto richiede la proliferazione di diversi tipi cellulari. La proliferazione delle cellule epiteliali media la ri-epitelizzazione e quella delle cellule endoteliali media la formazione di nuovi vasi sanguigni. I fibroblasti dopo aver proliferato, sono responsabili della formazione della matrice extracellulare, attraverso la produzione di collagene e altre proteine della matrice. **L'insieme di fibroblasti, macrofagi, vasi sanguigni neoformati e collagene da origine al tessuto di granulazione.**

**Rimodellamento tissutale** che consiste nella sostituzione progressiva del tessuto di granulazione con la cicatrice.

## Formazione del tessuto di granulazione



Il tessuto di granulazione è caratterizzato dalla presenza di vasi neoformati immersi in un tessuto connettivo lasso in cui sono presenti fibroblasti e macrofagi. Questo tessuto prende il nome dal suo aspetto che è rosato, morbido granulare dovuto alla presenza dei neo capillari, dalla proliferazione dei fibroblasti e dalla deposizione di tessuto connettivo lasso.



**I macrofagi attivati alternativamente (M2)** svolgono un ruolo centrale nel processo di formazione del tessuto di granulazione durante la riparazione. I macrofagi forniscono i fattori di crescita per le cellule endoteliali e i fibroblasti e stimolano la produzione di collagene da parte dei fibroblasti.

## Tessuto di granulazione

