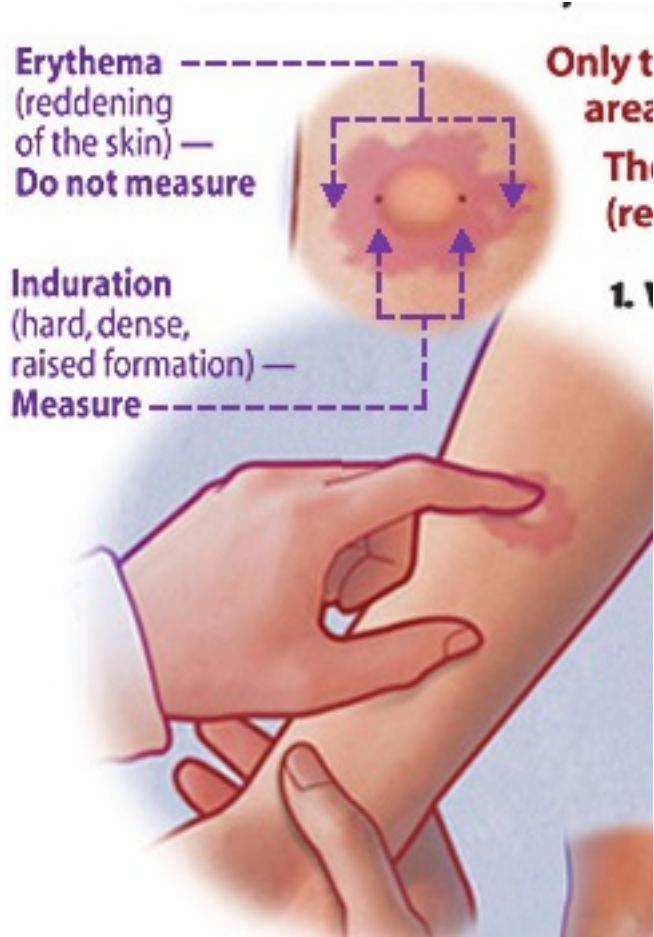


# Ipersensibilità di tipo IV

Le reazioni di ipersensibilità causate da linfociti T sono definite di tipo IV o di tipo ritardato perché si manifestano 1-3 giorni dopo il contatto con l'antigene

# Le reazioni di ipersensibilità ritardata (delayed type hypersensitivity)



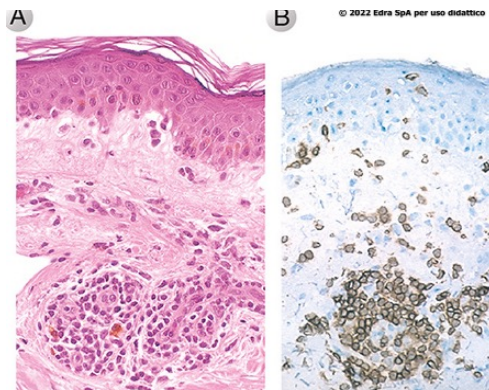
Un tipico esempio di reazione di ipersensibilità ritardata è rappresentato dal ponfo che si sviluppa in seguito al test di Mantoux o tuberculin skin test (TST) in individui che sono entrati in contatto con il *Mycobacterium tuberculosis*.

Questo test viene utilizzato per verificare in un individuo l'esistenza di una infezione da *M. tuberculosis*. Nel test viene iniettata, per via intradermica una piccola quantità di PPD (**un cocktail di antigeni micobatterici estratti dal bacillo tubercolare**) dopo 48-72 ore si verifica l'apparizione di un ponfo duro dovuto alla reazione di ipersensibilità ritardata.

Le reazioni DTH (delayed type hypersensitivity) sono caratterizzate da danno tissutale e da infiammazione. Tali reazioni sono causate da linfociti T CD4+ appartenenti alla sottopopolazione Th1 e dai linfociti T CD8+.

I linfociti T responsabili di tali reazioni possono essere autoreattivi o specifici per antigeni estranei. Infatti le reazioni DTH possono avvenire come danno collaterale a risposte immuni protettive contro un microrganismo oppure possono essere completamente patologiche come in alcune malattie autoimmuni.

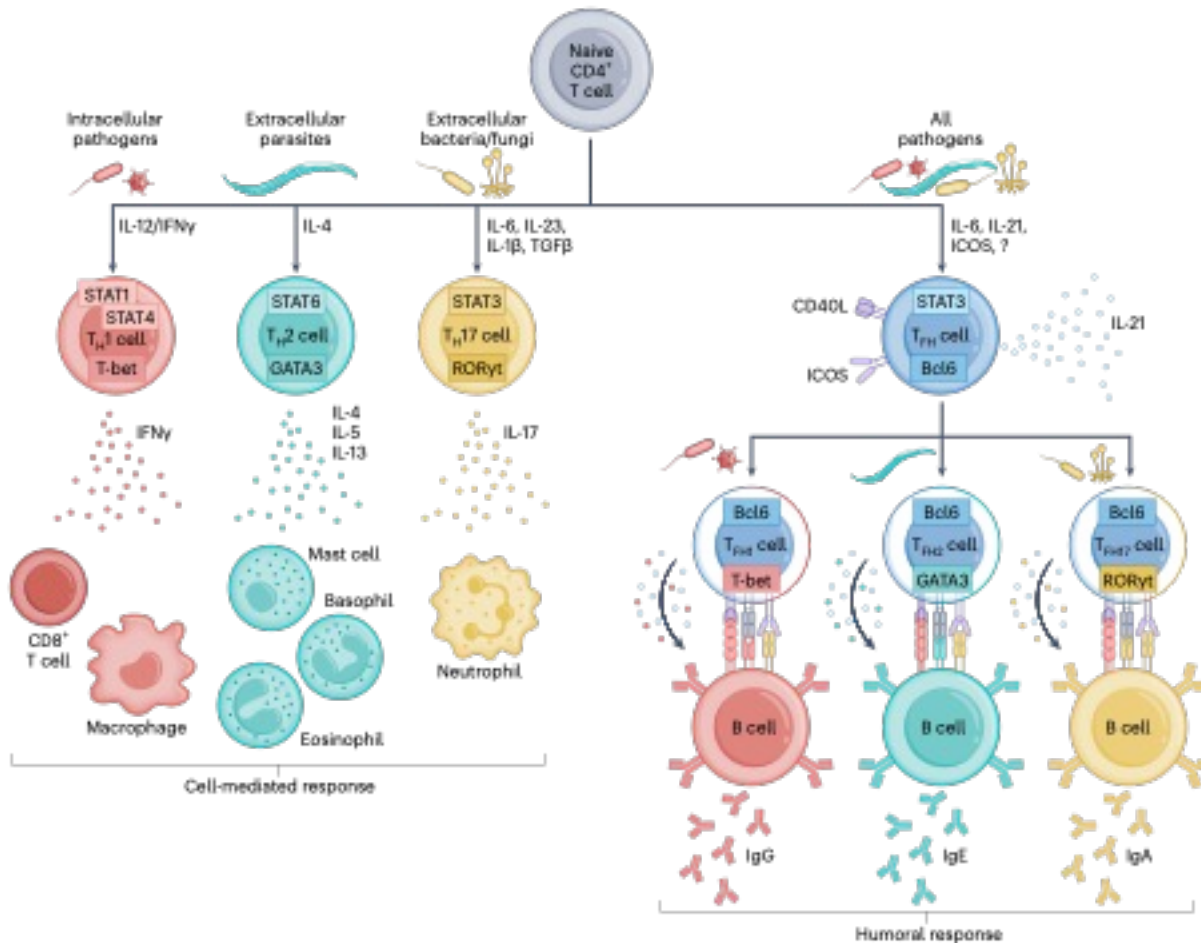
# Caratteristiche funzionali dei linfociti Th1



Le risposte Th1 predominano nella risposta immunitaria a diversi patogeni che includono i batteri intracellulari e i virus. Le risposte Th1 hanno un ruolo nella risposta antitumorale e nella risposta ad autoantigeni nelle malattie autoimmuni. Le citochine tipicamente prodotte dalle cellule Th1 sono l'IFN- $\gamma$  e il TNF- $\alpha$ . L'IFN- $\gamma$  agisce attivando i macrofagi e potenziandone l'attività di degradazione delle sostanze fagocitate. Inoltre i linfociti Th1 attraverso la secrezione di TNF- $\alpha$  e linfo tossina favoriscono il reclutamento dei leucociti ed il processo infiammatorio caratterizzato da un infiltrato linfo-monocitario. L'attivazione macrofagica mediata dai linfociti T può causare un danno ai tessuti normali circostanti. La reazione infiammatoria lesiva e tale reazione è chiamata Delayed-Type hypersensitivity= ipersensibilità di tipo ritardato

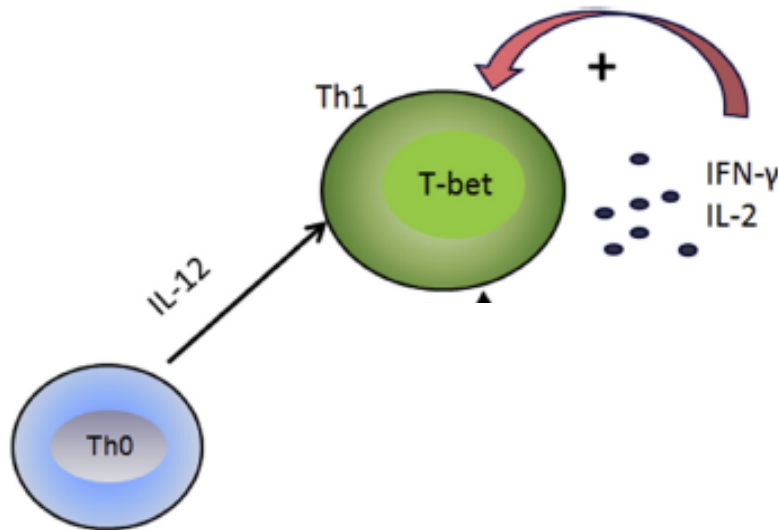
**Morfologia di una reazione da ipersensibilità ritardata.** Infiltrato perivascolare dermico di cellule mononucleate.

# Principali sottopopolazioni di linfociti T helper



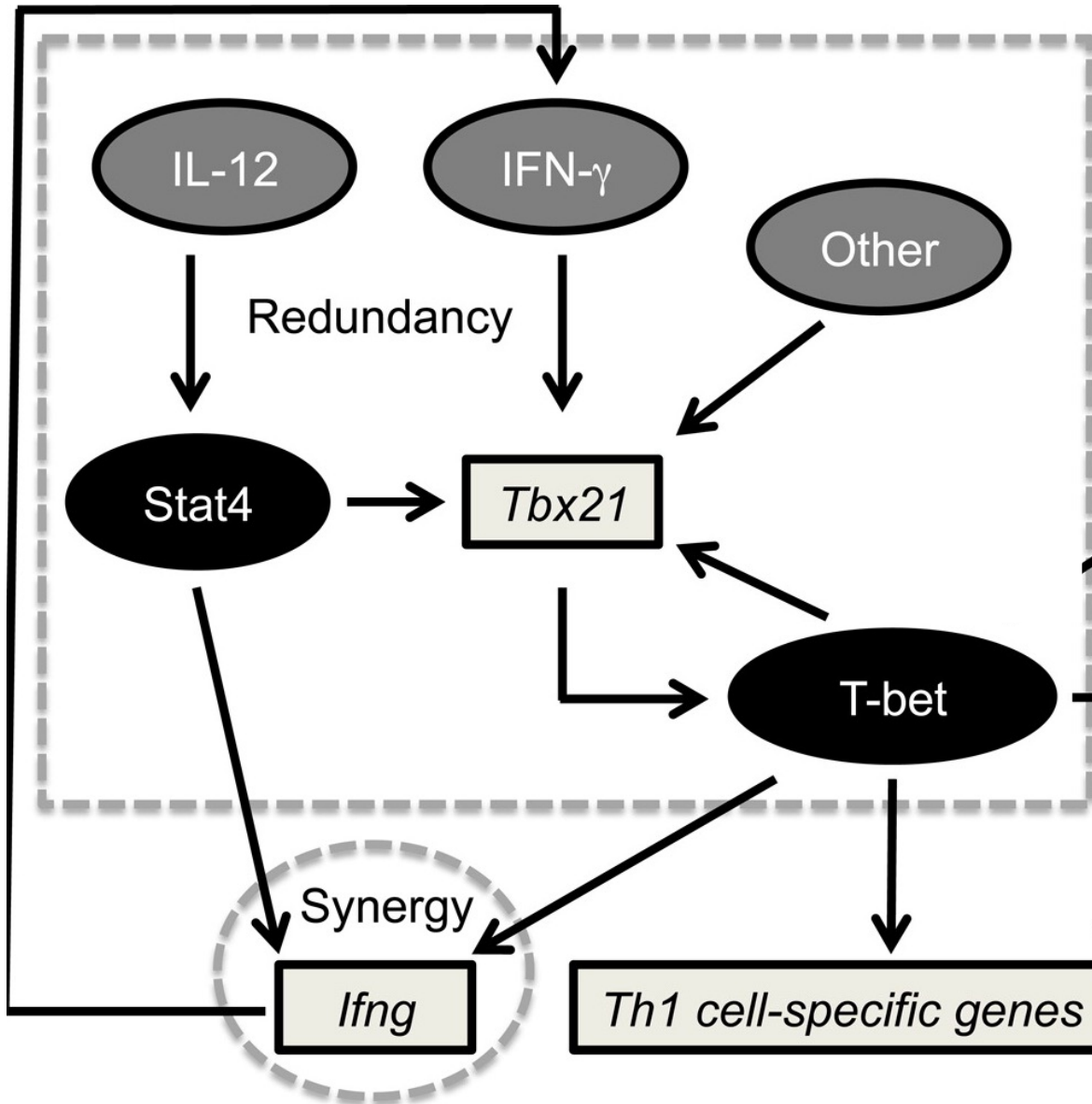
I linfociti T CD4<sup>+</sup> differenziano in sottopopolazioni di linfociti specializzati nel sostenere le risposte cellulari o anticorpali. I patogeni intracellulari inducono risposte Th1 produttori IFN- $\gamma$ , che potenziano le funzioni dei macrofagi. I parassiti extracellulari inducono Th2 esprimenti GATA3 produttori IL-4, IL-5 e IL-13 che attivano eosinofili basofili e mastociti. I batteri extracellulari e i funghi inducono i Th17 produttori IL-17 e IL-22 che promuovono il reclutamento di neutrofili. I T<sub>fh</sub> sono specializzati nel cooperare con il linfociti B nella risposta anticorpale.

# Caratteristiche dei linfociti Th1



I linfociti Th1 esprimono il fattore trascrizionale T-bet. T-bet è il fattore trascrizionale che caratterizza i linfociti Th1. L'IFN- $\gamma$  e l'IL-12 inducono l'espressione di T-bet. T-bet regola l'espressione dell'IFN- $\gamma$ . I linfociti T CD4+ naive non esprimono T-bet.

# Il fattore trascrizionale T-bet è indotto da IL-12 e da IFN- $\gamma$



Utilizzando topi transgenici C57BL/6 T-bet-ZsGreen reporter (TBGR) è stato dimostrato che:

- IL-12 and IFN- $\gamma$  sono ridondanti nell'indurre T-bet nelle cellule T in vitro e in vivo

- La segnalazione dipendente da IFN- $\gamma$  non è indispensabile per generare linfociti T produttori IFN- $\gamma$

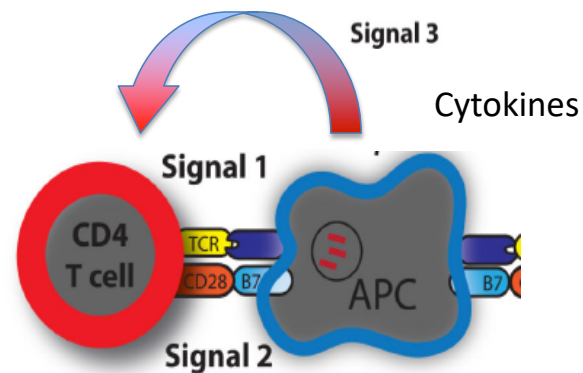
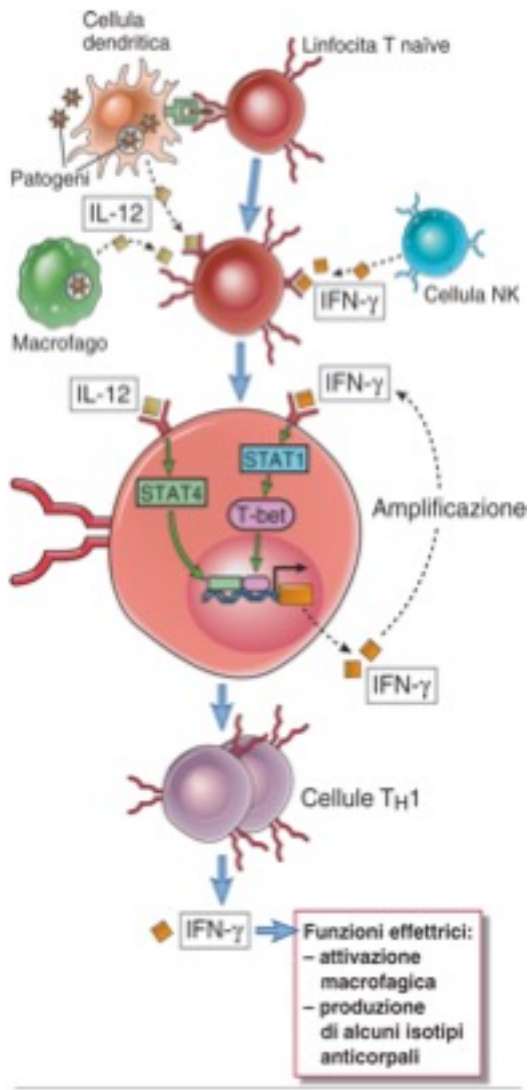
- T-bet promuove la propria espressione quando è indotto dall'IL-12 o dall'IFN- $\gamma$ .

- T-bet collabora con STAT4 nella produzione di IFN- $\gamma$



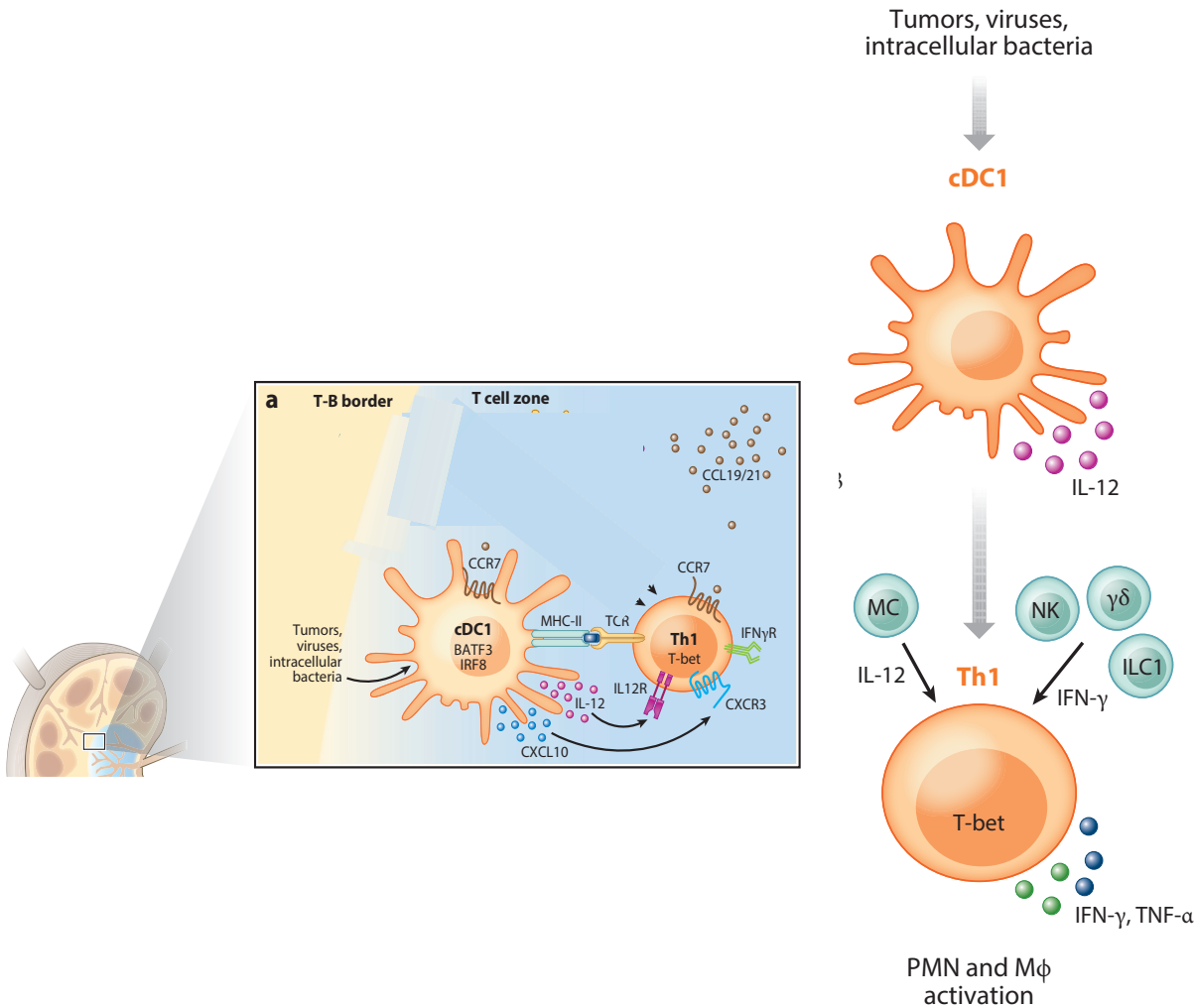
# Differenziamento dei linfociti Th1

L'IL-12 è prodotta dalle cellule dendritiche in risposta ai batteri intracellulari. Il recettore per l'IL-12 attiva STAT4 il quale induce l'espressione di T-bet che con STAT4 mediano la produzione di l'IFN- $\gamma$ . Anche la stimolazione da parte dell' l'IFN- $\gamma$  da solo indipendentemente dall'IL-12 attraverso l'attivazione di STAT1 potrebbe indurre T-bet. Questi fattori trascrizionali sono coinvolti nel differenziamento dei linfociti T naive verso la sottopopolazione Th1.



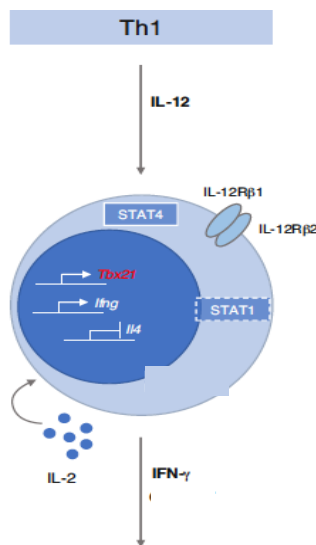
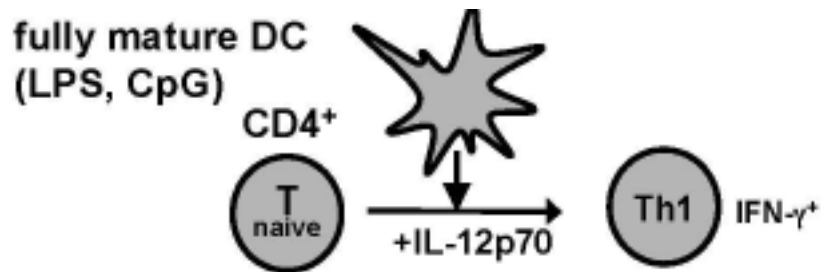


# Segnali che promuovono il differenziamento dei Th1



Oltre all'IL-12 e all'IFN- $\gamma$  altri segnali quali l'IL-18, gli interferoni di tipo I, elevate dosi di antigeni, una alta affinità del TCR per l'antigene sono in grado di promuovere il differenziamento dei T naive in Th1

# I linfociti Th1 mediano la risposta immunitaria verso i microrganismi che sopravvivono all'interno dei fagociti



Il differenziamento dei linfociti T in Th1 è stimolato da molti batteri intracellulari (Micobatteri, Listeria) che infettano i macrofagi.

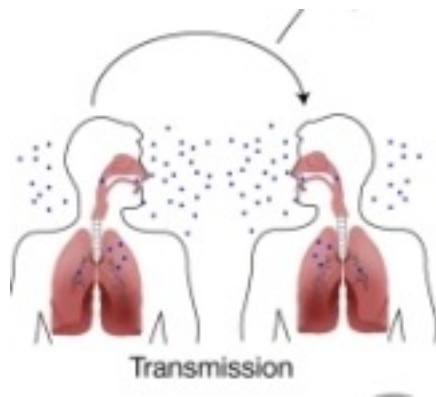
Una caratteristica in comune fra tutte queste infezioni è la stimolazione di cellule dell'immunità innata producenti IL-12. La produzione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche è considerata l'evento critico nella polarizzazione delle cellule T naive in Th1.

I topi deficienti in IL-12 mostrano un profondo difetto di linfociti Th1.

I pazienti con difetti del recettore dell'IL-12 (IL-12R) mostrano difetti nella produzione di IFN- $\gamma$  e sono soggetti a infezioni da parte di Micobatteri e Salmonella.

**La tubercolosi è un esempio di infezione da parte di batteri intracellulari in cui l'immunità protettiva e l'ipersensibilità coesistono e le lesioni sono causate dalla risposta dell'ospite.**

# Infezione da *M. tuberculosis*



La tubercolosi è causata dall'infezione da parte di *M. tuberculosis* .

Tale infezione si trasmette per via aerea quando un individuo infetto attraverso la tosse rilascia particelle aeree (droplet) che contengono *M. tuberculosis*.

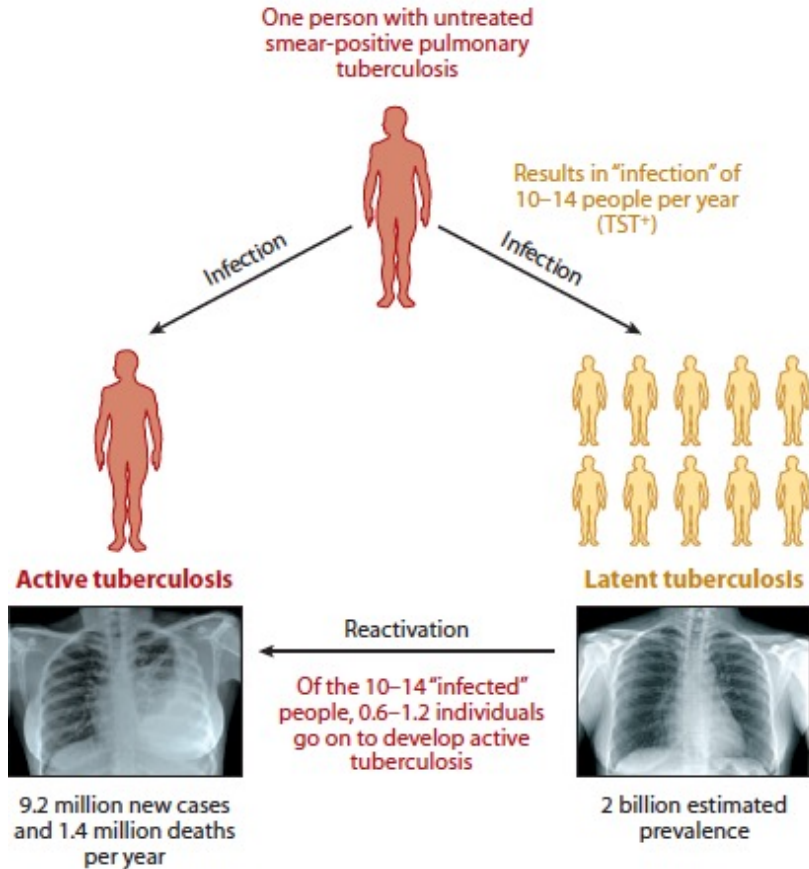
Questi droplets presentano un diametro di 1-5 micron.

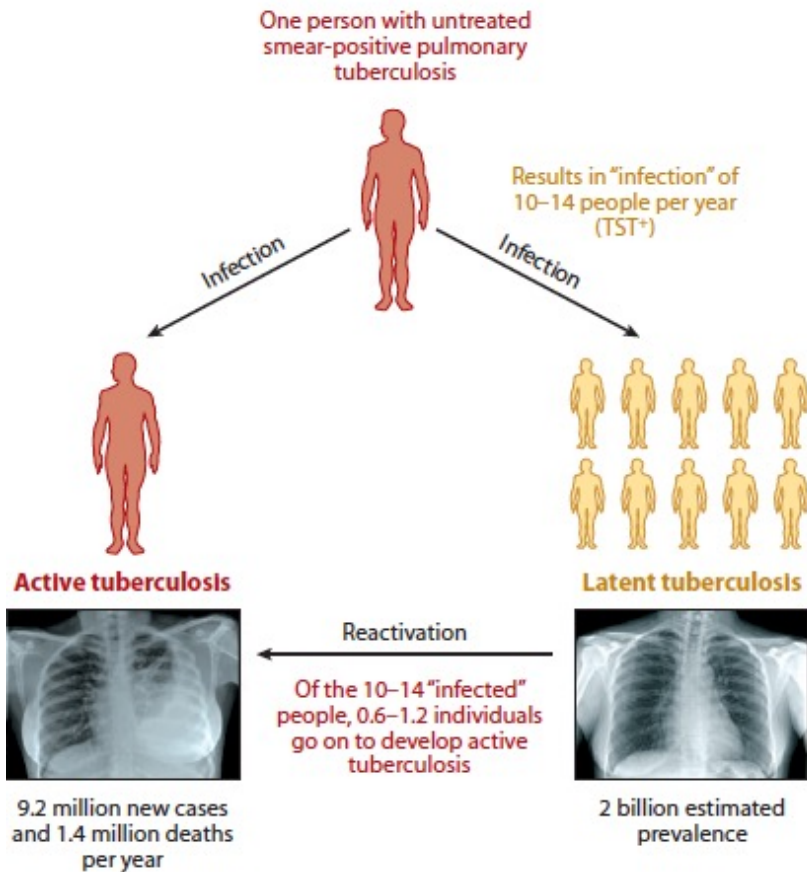
# Epidemiologia dell'infezione da *M. tuberculosis*

La tubercolosi è causata dall'infezione dei polmoni da parte del bacillo *Mycobacterium tuberculosis*, identificato per la prima volta nel 1882 da R. Koch.

La malattia è nella maggior parte dei casi polmonare (70%) ma può essere disseminata ad altri organi quali i linfonodi, le ossa, le meningi. L'infezione da parte di *M. tuberculosis* può evolvere in: i) malattia attiva e sintomatica II) malattia latente e asintomatica. La prima è caratterizzata da febbre, perdita di peso, danno tissutale nella sede dell'infezione, presenza del batterio nello sputo. La seconda può essere evidenziata misurando la reattività dei linfociti T ad antigeni di *M. tuberculosis*.

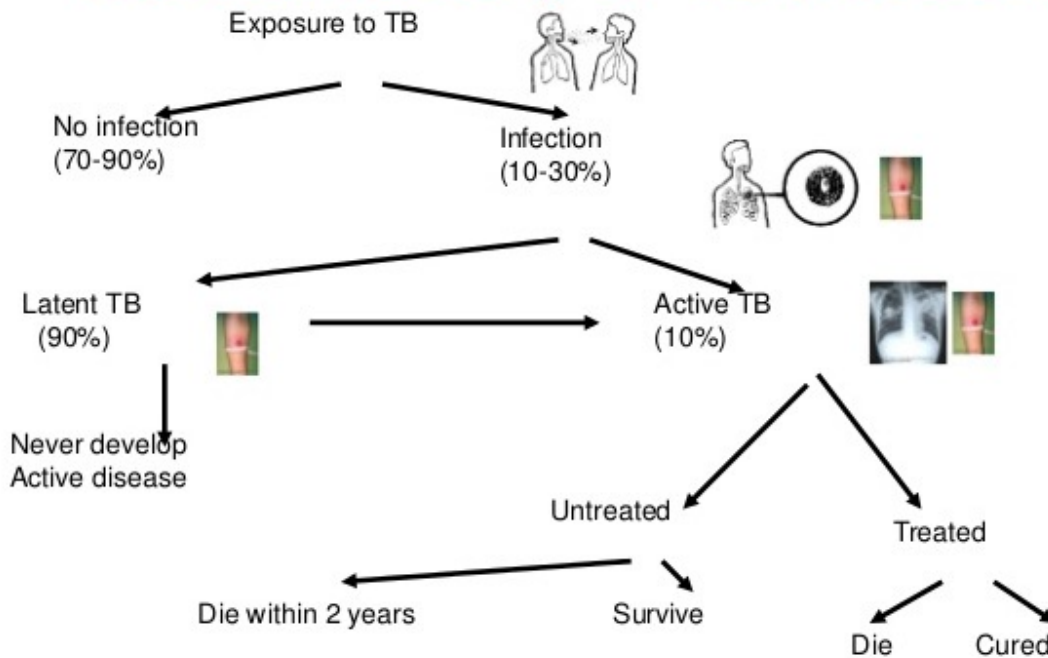
Sono circa 9 milioni i casi all'anno di TB attiva diagnosticati e si stima che circa 1/3 della popolazione mondiale sia infettata da *M. tuberculosis* in modo asintomatico.





In seguito ad infezione da parte di *M. tuberculosis* il 5-10% di questi individui sviluppa TB attiva nel corso della loro vita. Il micobatterio della tubercolosi non è particolarmente contagioso si stima che un individuo infetto possa infettare fra le 3 e le 10 persone per anno.

# Natural History of TB Infection



L'infezione da *M. tuberculosis* può evolvere in:

I) forma sintomatica di malattia attiva che determina la distruzione del tessuto nel sito dell'infezione. Questa si associa alla replicazione dei batteri. La cura consiste nel trattamento con più farmaci per 6 mesi.

II) forma asintomatica con infezione allo stato latente. In questa forma l'infezione da *M. tuberculosis* o il precedente contatto con il batterio possono essere dimostrati verificando la reattività del sistema immune dell'individuo al test della tubercolina.

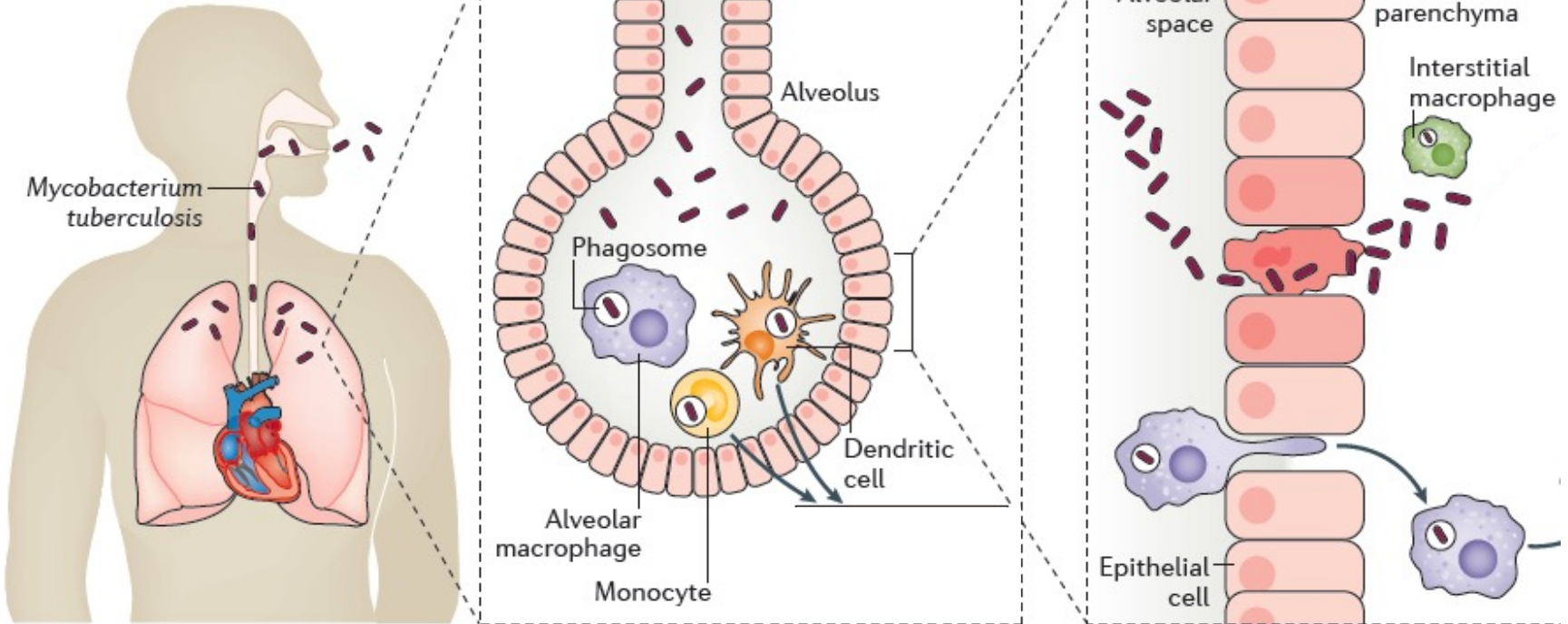
III) Il trattamento standard della tubercolosi comprende l'uso di 4 farmaci: isoniazide, rifampicina, pirazinamide, etambutolo.

Resistenza a tutti i farmaci può avvenire.



# Fasi iniziali dell'infezione da *M. tuberculosis*

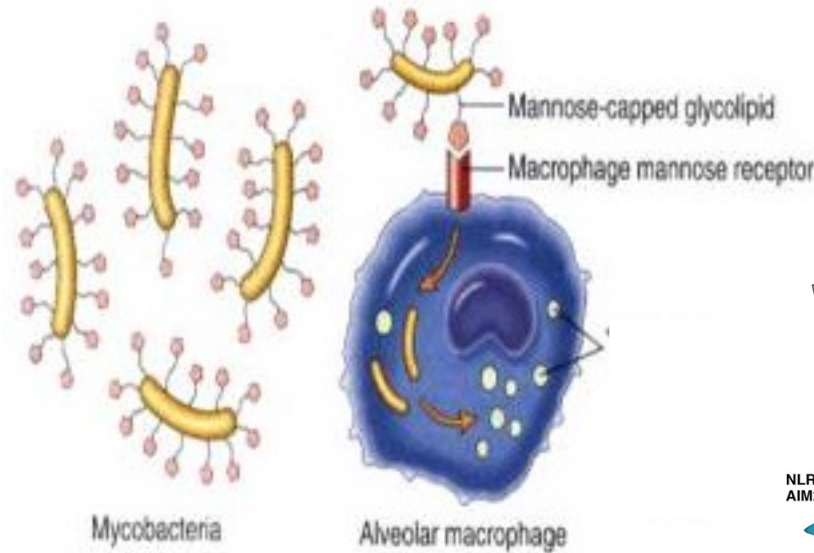
## a Latent infection



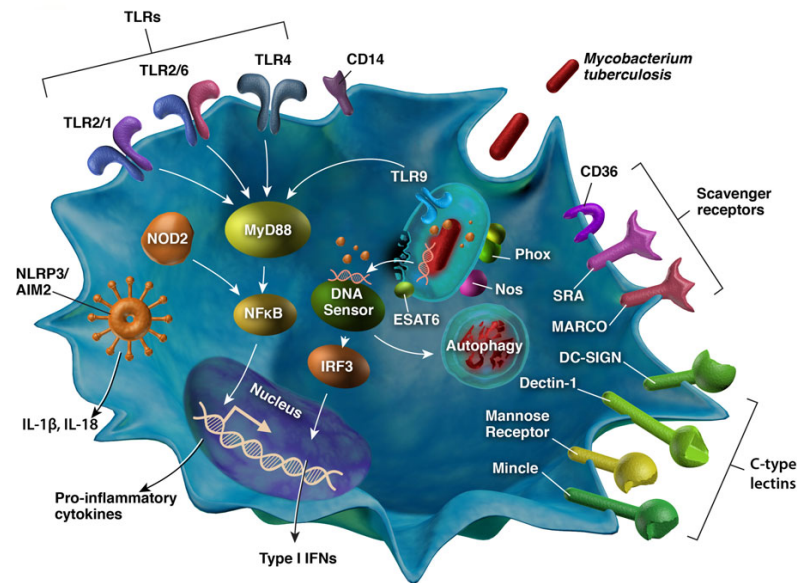
L'infezione ha inizio quando il micobatterio raggiunge gli alveoli dove incontra i macrofagi alveolari. Se questa prima linea di difesa non riesce ad eliminare il batterio, i macrofagi infettati dopo circa due settimane dall'infezione si localizzano nello spazio interstiziale del polmone. L'accesso del batterio al parenchima polmonare avviene principalmente attraverso la trasmigrazione dei macrofagi infettati.

# Recettori coinvolti nella entrata di *M. tuberculosis* nei macrofagi

A. PRIMARY PULMONARY TUBERCULOSIS (0-3 weeks)

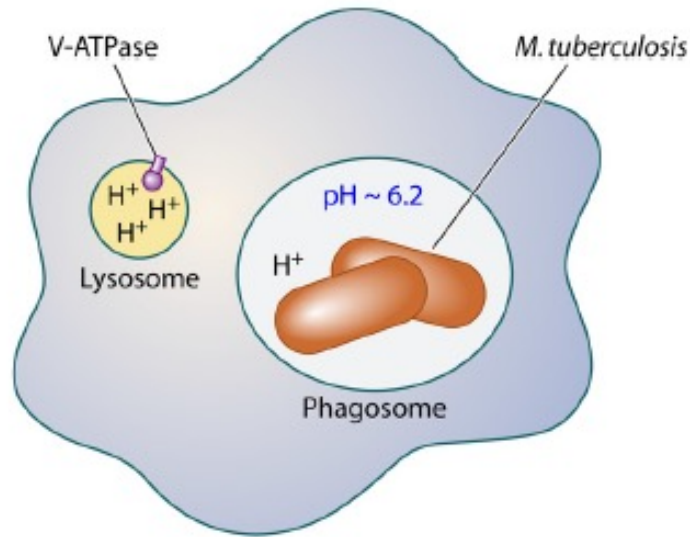


L'entrata di *M. tuberculosis* all'interno dei macrofagi è mediata da diversi tipi di recettori cellulari appartenenti alla famiglia degli scavenger receptor o delle lectine di tipo C.



Receptor	<i>M. tuberculosis</i> ligand(s)	Comment
SRs		
Class A (SR-A1, MARCO)	Unknown	SRs display broad ligand-binding ability; ligands include lipoproteins, polyanionic molecules, gram-positive and gram-negative bacteria
Class B (CD36, SR-B1)		
Mannose receptor (CD207)	ManLAM, PIMs, arabinomannan, mannans, mannoproteins	Thought to be anti-inflammatory and to inhibit delivery of mycobacteria to the lysosome

# Traffico intracellulare di *M. tuberculosis*



*M. tuberculosis* all'interno del macrofago alveolare previene la normale maturazione del fagosoma.

Il batterio persiste all'interno di compartimenti che assomigliano agli endosomi precoci (Rab5+). Tali compartimenti non presentano i tipici marcatori degli endosomi tardivi e dei lisosomi fra cui la v-ATPase e presentano un pH modestamente acido. Questo vacuolo non è particolarmente ostile in termini di pH e attività degli enzimi idrolitici.

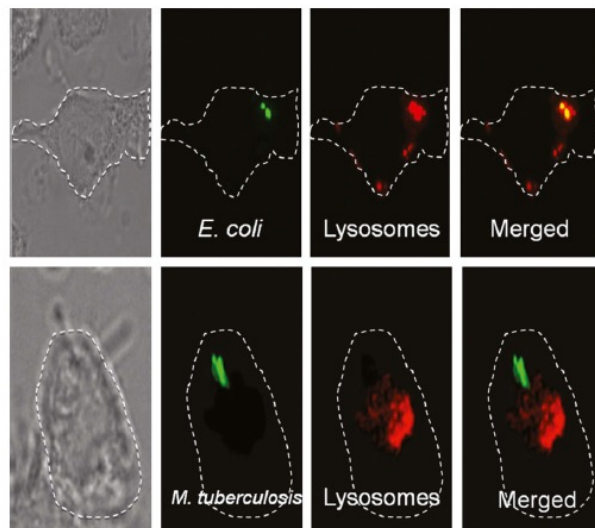
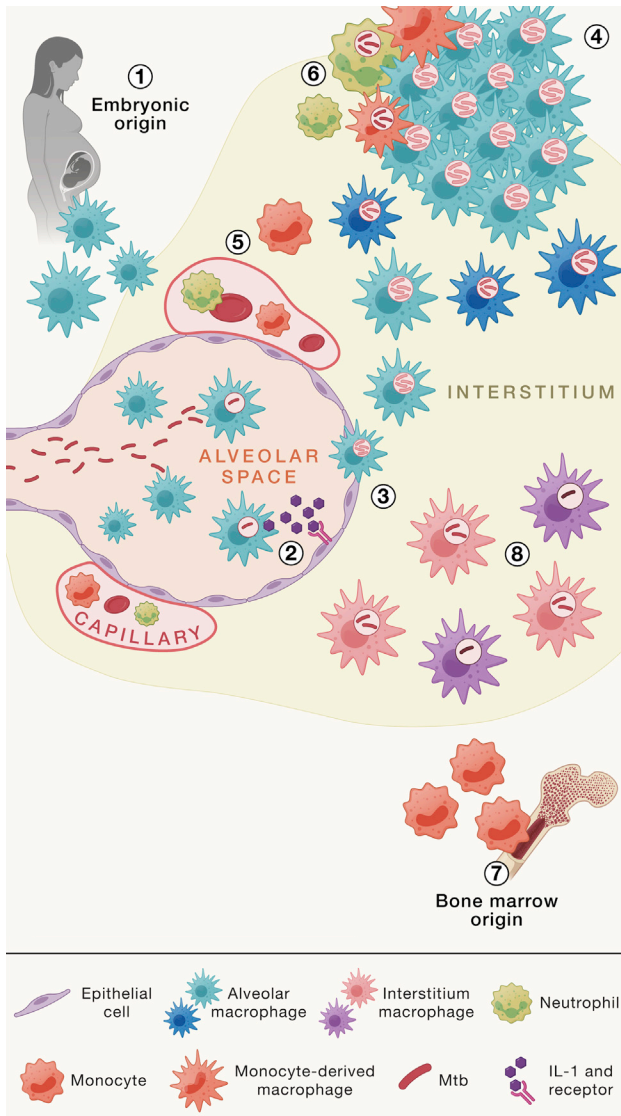


Fig. 2. Confocal microscopy of THP-1 macrophages infected with *E. coli* or *Mtb*. Localization of *E. coli* or *Mtb* with lysosomes is detected with immunofluorescence staining. Lysosomes are stained with LysoTracker Red dye (Red), and bacteria are labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (green) before infection. While *Mtb*-containing phagosome does not fuse with the lysosomes (Bottom Panel), the *E. coli*-containing phagosome co-localize with the LysoTracker Red dye, indicating phagosome-lysosome fusion event (Top Panel). Courtesy of Dr. Dennis Wong.

## Interazione fra *M.tuberculosis* e macrofagi

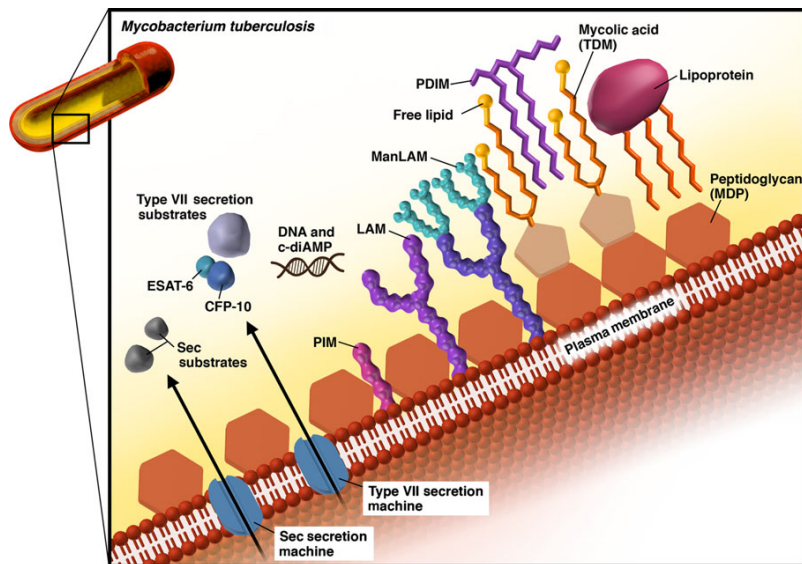
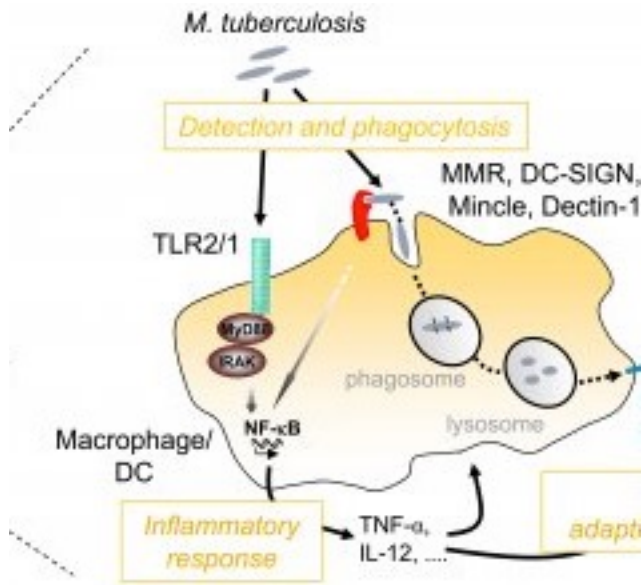


I macrofagi alveolari non sono in grado di eliminare il micobatterio e rappresentano la nicchia in cui *M. tuberculosis* replica.

Dopo circa due settimane dall'infezione i macrofagi infettati traslocano nel parenchima polmonare e attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie richiamano altre cellule residenti (macrofagi interstiziali, cellule dendritiche) o circolanti (neutrofili e monociti).



# *M.tuberculosis* attiva i macrofagi a produrre citochine pro-infiammatorie

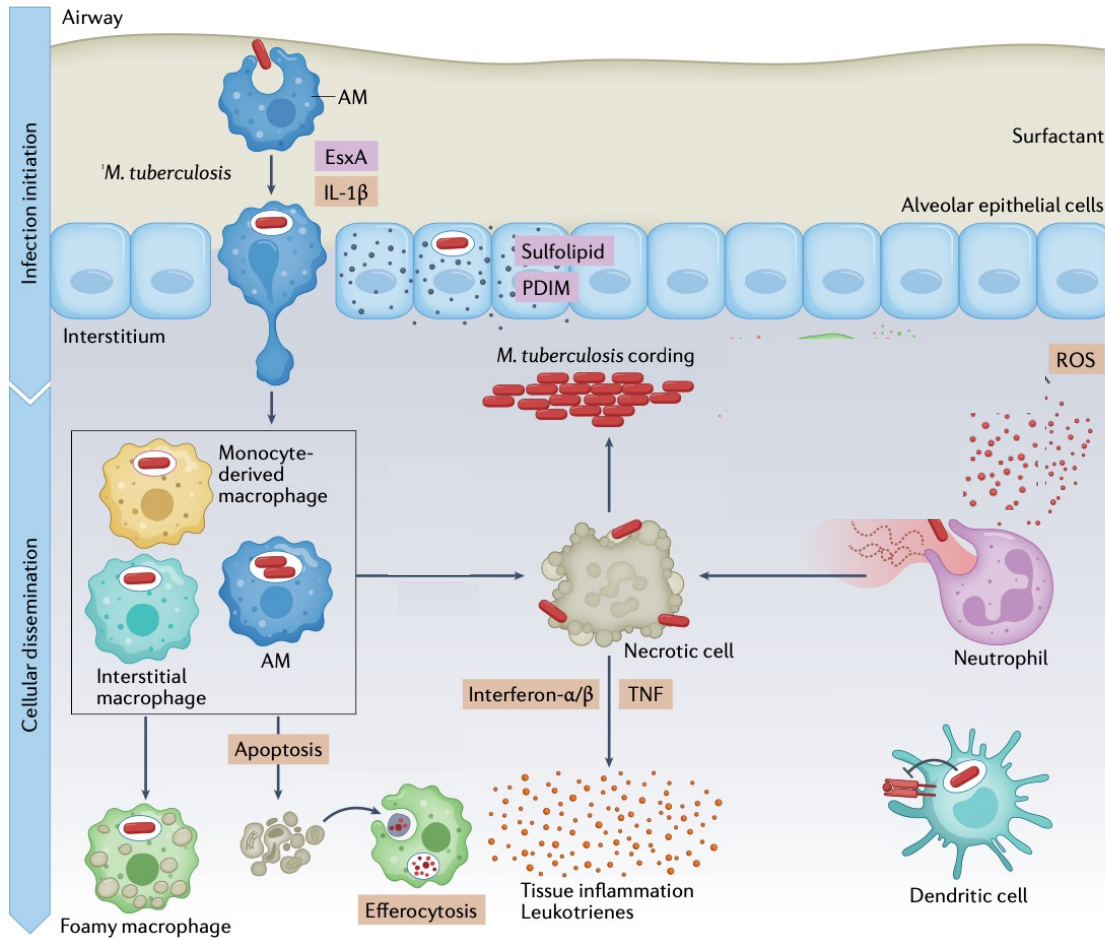


Nel parenchima polmonare *M. tuberculosis* stimola una più forte risposta infiammatoria infettando i macrofagi e le cellule dendritiche. Le lipoproteine di *M. tuberculosis* attivano i macrofagi a produrre citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-12 e chemochine).

L'attivazione dei macrofagi da parte di *M. tuberculosis* avviene principalmente attraverso il legame delle lipoproteine batteriche con il TLR2.

I macrofagi attivati richiamano leucociti dal circolo.

# Localizzazione del micobatterio nell'interstizio polmonare

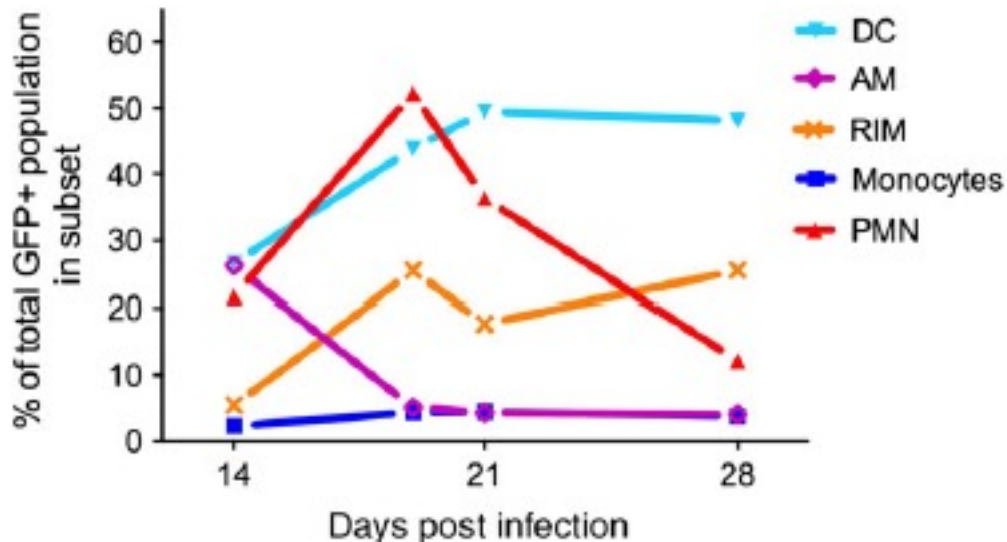


*M. tuberculosis* infetta sia i macrofagi interstiziali che i macrofagi derivati dai monociti, le cellule dendritiche e i neutrofili.

*M. tuberculosis* non è eliminato dai neutrofili ma nei neutrofili e in alcune sottopopolazioni di macrofagi induce necrosi.

Il reclutamento di altre cellule sia residenti nel parenchima polmonare (macrofagi e cellule dendritiche) che reclutate dal circolo rappresenta l'inizio della formazione del granuloma tubercolare.

# Popolazioni cellulari infettate da *M. tuberculosis* nel tempo

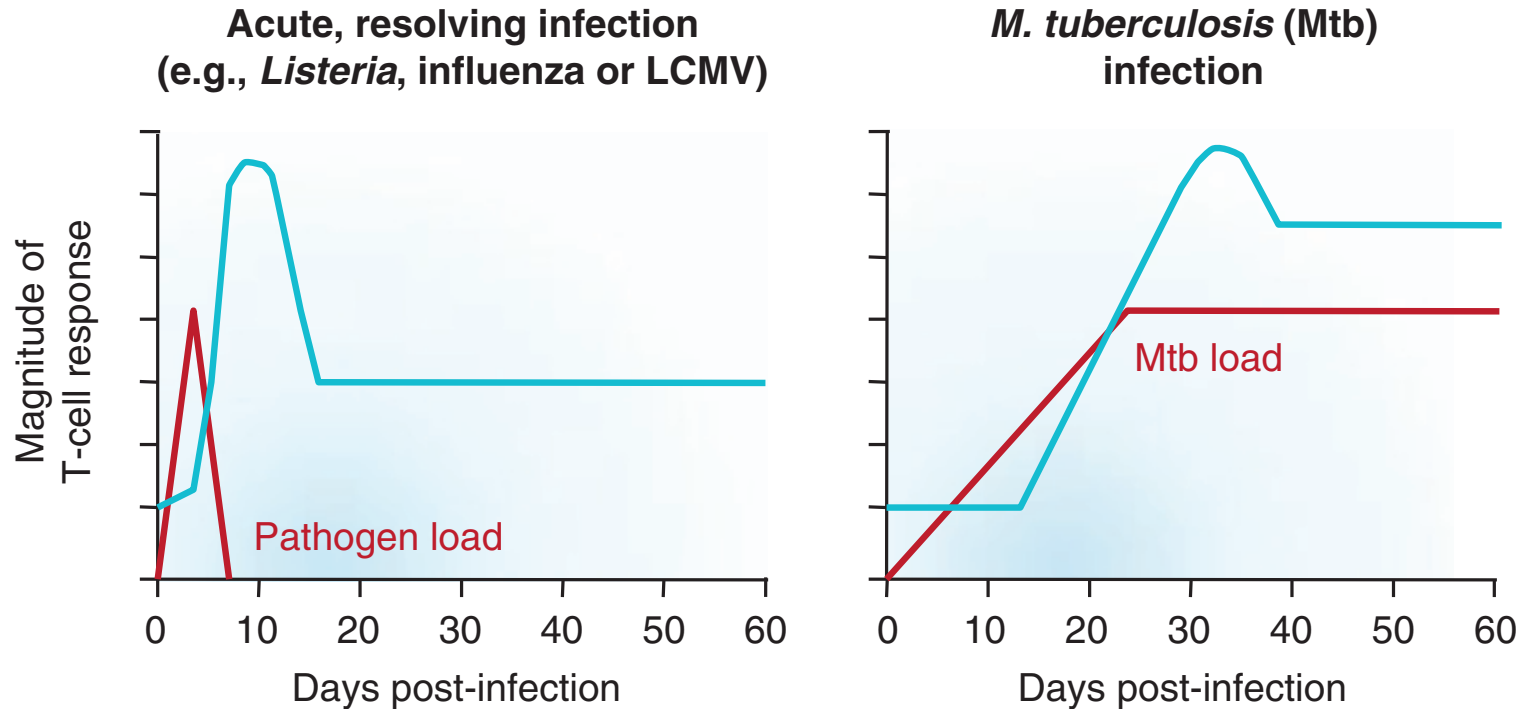


**Fig. 1. Time course and distribution of *M. tuberculosis* by lung cell subset.** The graph shows the distribution of the population of *M. tuberculosis*-infected cells in the lungs, according to the proportion of the bacterial population in each myeloid cell subset, and shows the progression over time after infection. DC, dendritic cells; AM, alveolar macrophages; RIM, recruited interstitial macrophages; PMN, neutrophils.

Esperimenti di citofluorimetria a flusso effettuati su topi infettati per via aerosolica con *M. tuberculosis* esprime la proteina GFP (green fluorescent protein) hanno dimostrato che *M. tuberculosis* risiede oltre che nei macrofagi anche nelle cellule dendritiche e nei neutrofili.

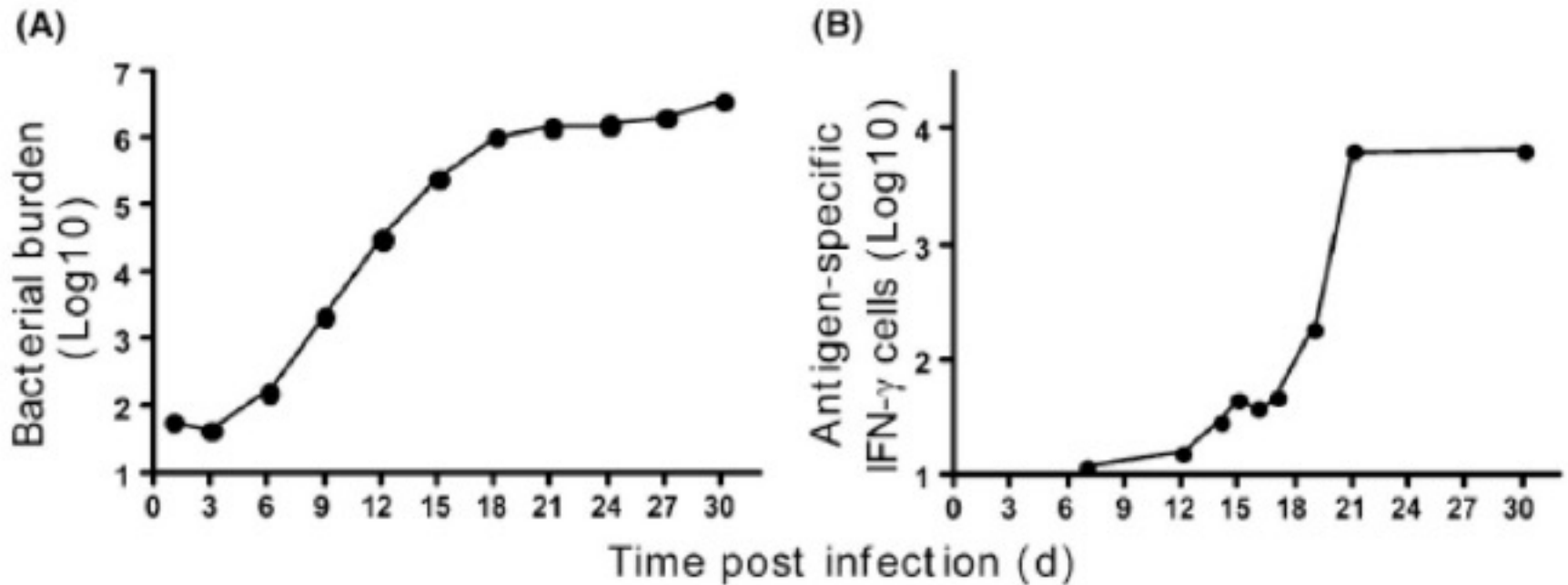


## L'immunità adattativa verso *M. tuberculosis* si sviluppa più tardivamente rispetto alle altre infezioni



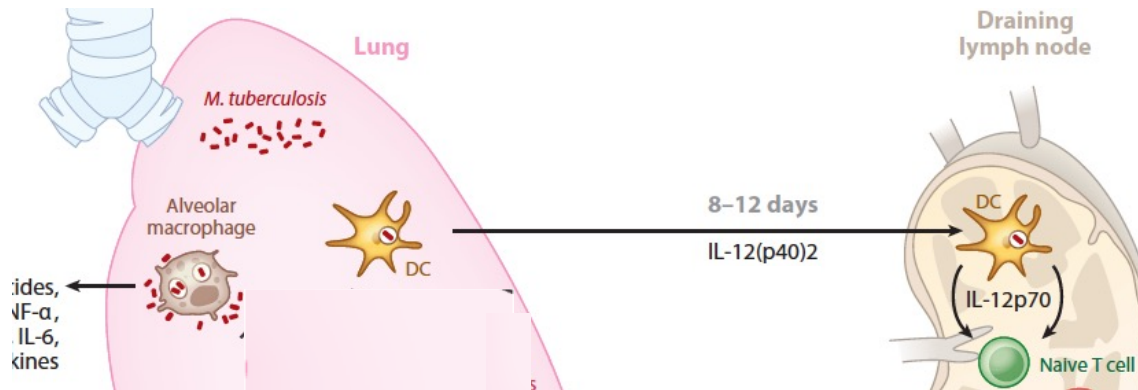
Nelle infezioni acute, autolimitanti le risposte T hanno inizio 3-5 giorni dopo l'infezione e raggiungono la massima intensità dopo 7-8 giorni; dopo l'infezione da *M. tuberculosis* le risposte T hanno inizio dopo più di 10 giorni e raggiungono i livelli massimi dopo 30-40 giorni. Per effettuare la diagnosi di infezione è necessario che siano trascorse almeno 6 settimane dalla infezione. Il tuberculin skin test richiede che l'individuo sia stato infettato da almeno 6 settimane per diventare positivo.

## L'induzione di linfociti Th1 specifici per *M. tuberculosis* nel polmone si associa ad un arresto della replicazione batterica



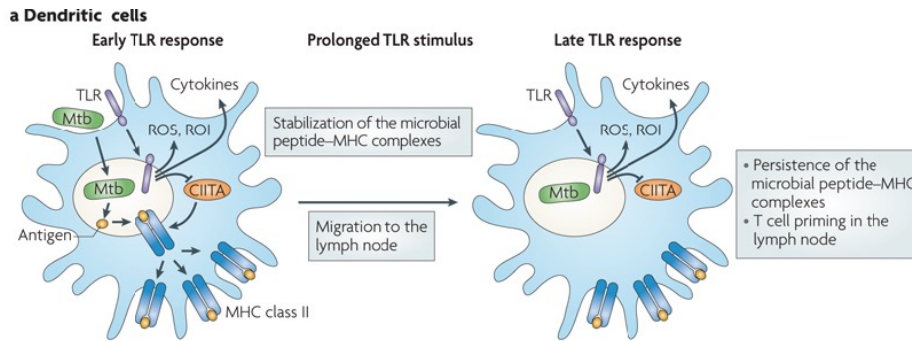
La risposta immune adattativa, rappresentata dalla generazione di linfociti Th1 è necessaria per contenere l'infezione da *M. tuberculosis*. La risposta Th1 può essere evidenziata dopo 2-8 settimane dall'infezione con il micobatterio.

# L'attivazione della risposta T Mtb specifica avviene nei linfonodi da parte delle cellule dendritiche



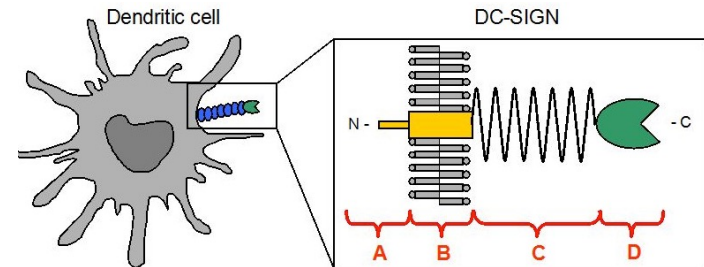
L'attivazione della risposta immune adattativa verso *M. tuberculosis* avviene nei linfonodi. Esperimenti effettuati somministrando via aerosol *M. tuberculosis* esprime la GFP ai topi hanno dimostrato che le cellule dendritiche nei linfonodi sono responsabili della attivazione dei linfociti T.

# Induzione della risposta immune adattativa al Micobatterio della tubercolosi



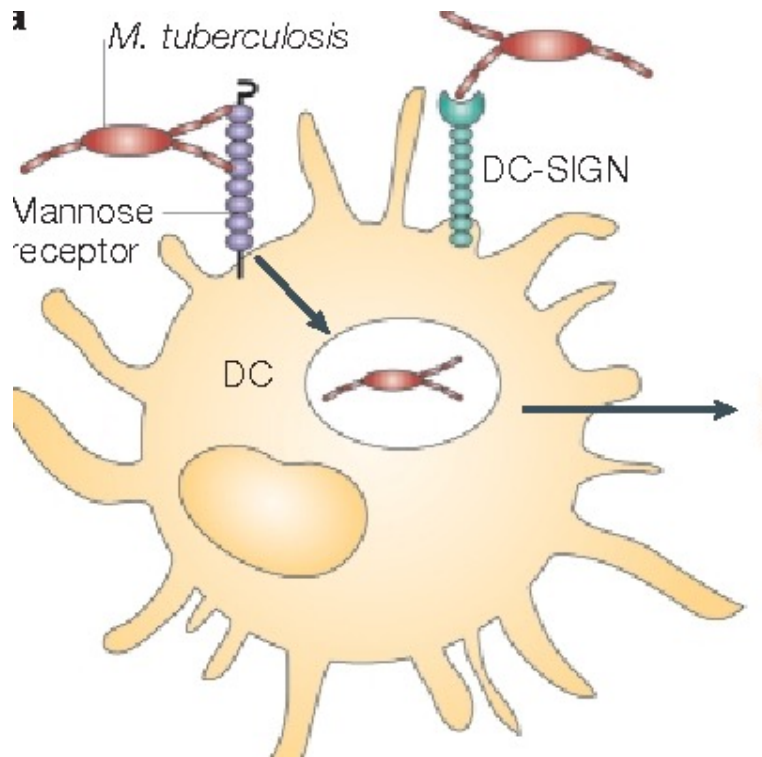
L'attivazione della risposta T diretta verso il *M. tuberculosis* avviene a livello dei linfonodi ad opera delle cellule dendritiche che dal polmone migrano nel linfonodo.

Le cellule dendritiche sono in grado di captare *M. tuberculosis* attraverso il recettore DC-SIGN (recettore lectinico di tipo C)



Receptor	<i>M. tuberculosis</i> ligand(s)	Comment
DC-SIGN (CD209)	ManLAM, PIMs, arabinomannan, lipomannan, 19-kD antigen	Major uptake receptor in human DCs; thought to be anti-inflammatory and inhibit DC maturation. There are seven paralogs in mice (SIGNR1-5, SIGNR7, SIGNR8)

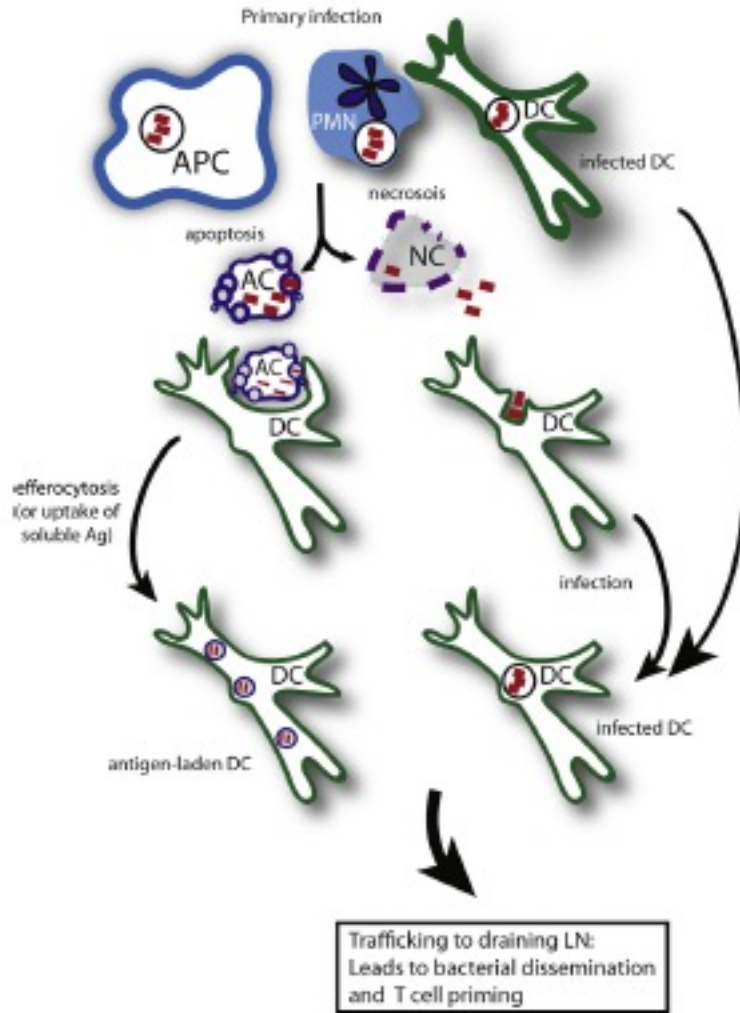
## La fagocitosi di *M.tuberculosis* inibisce la capacità delle DC di migrare nel linfonodo



Le DC infettate da *M. tuberculosis* sono difettive nella capacità di APC. Es: tali cellule mostrano una diminuzione dell'espressione di CCR7 e non sono in grado di migrare nel linfonodo. Il legame fra ManLAM e il DC-SIGN riduce la produzione di IL-12 da parte delle DC.

Se *M.tuberculosis* è fagocitato dai neutrofili e dai macrofagi che successivamente vanno incontro ad apoptosi le cellule dendritiche captano i corpi apoptotici e migrano nei linfonodi dove attiveranno i linfociti T.

# Le cellule dendritiche infettate o che hanno acquisito il Micobatterio dalle cellule apoptotiche migrano nel linfonodo dove attivano i linfociti T



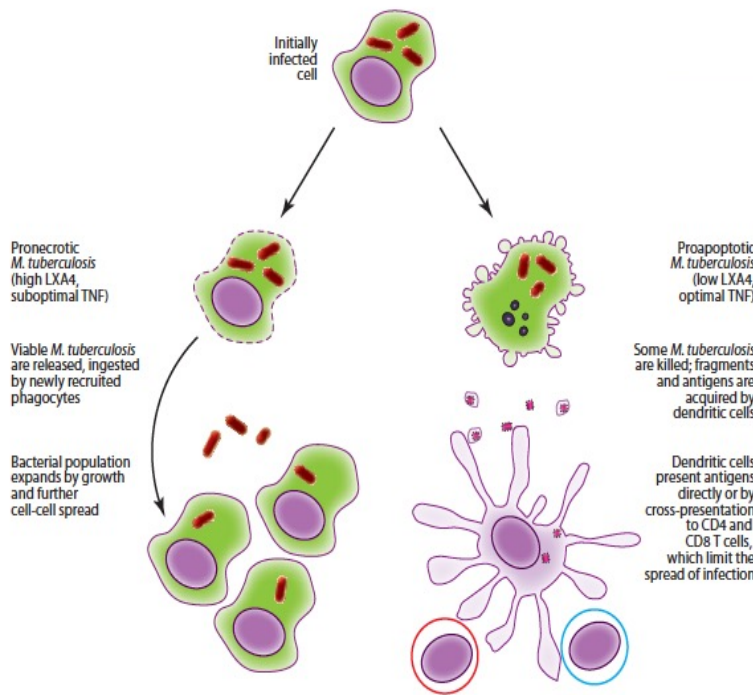
Le cellule dendritiche convenzionali migratorie possono essere infettate da *M. tuberculosis*. Queste mostrano un ritardo nella migrazione ai linfonodi.

# Diversi pathways di morte cellulare delle cellule infettate da *M. tuberculosis*

Subito dopo l'infezione *M.tuberculosis* si replica all'interno dei fagociti. La replicazione del batterio all'interno dei fagociti può indurre sia morte cellulare per necrosi che per apoptosi. La capacità del batterio di interferire con il processo apoptotico aumenta la virulenza di *M. tuberculosis*

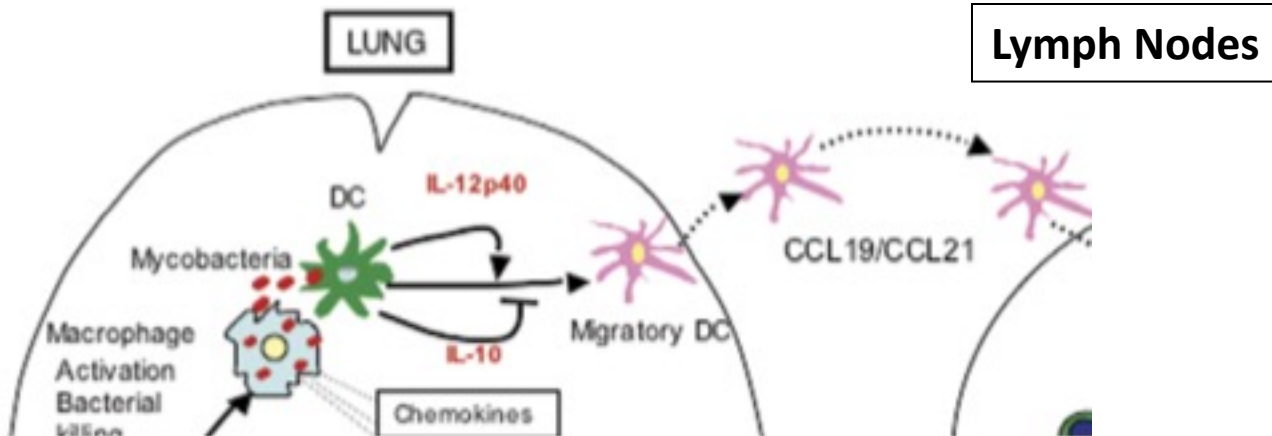
Batteri antiapoptotici e pronecrotici sono rilasciati dalle cellule morenti e sono fagocitati dai macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche circostanti diffondendo l'infezione. Batteri proapoptotici sono parzialmente uccisi nelle cellule in apoptosi e i costituenti cellulari sono captati dalle cellule dendritiche e presentati ai linfociti T sia naive che attivati che arrestano la progressione dell'infezione.

Ceppi virulenti di *M.tuberculosis* inibiscono la produzione di PGE2 (proapoptotica) e inducono la produzione di lipossina A4 (pronecrotica).





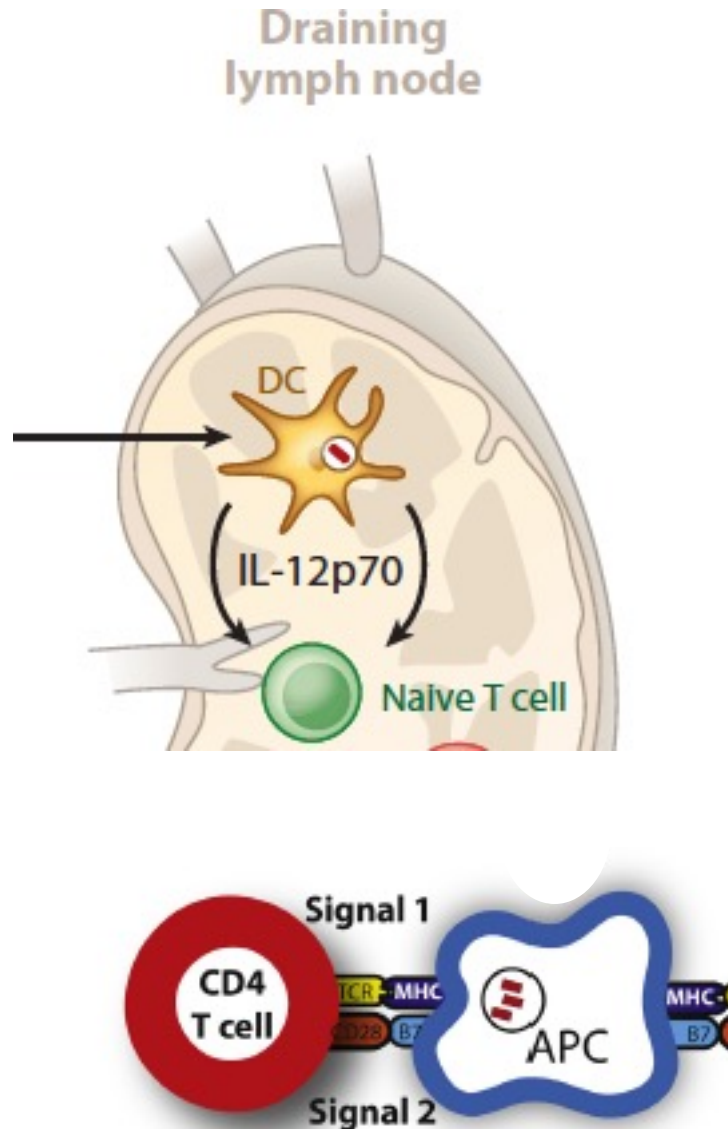
## La migrazione delle DC dal polmone ai linfonodi è guidata dalle chemochine CCL19/21 in topi infettati da *M. tuberculosis*



I topi plt che non esprimono le chemochine CCL19/CCL21 (ligandi del CCR7) infettati per via aerosol da *M. tuberculosis* presentano una riduzione del 95% di batteri e di DC nei linfonodi.

## L'induzione dei linfociti Th1 *M. tuberculosis* specifici necessita dell'IL-12

Nel linfonodo le DC presentano gli antigeni di *M. tuberculosis* ai linfociti T naive. Le DC producono l'IL-12 che è la citochina fondamentale nello sviluppo dei linfociti Th1.



I topi IL-12p35 o IL-12p40 KO mostrano un aumento della crescita dei batteri rispetto ai topi normali quando infettati con *M. tuberculosis* o BCG. I topi KO per l'IL-12p40 o p35 non sviluppano linfociti T in grado di produrre IFN- $\gamma$ .