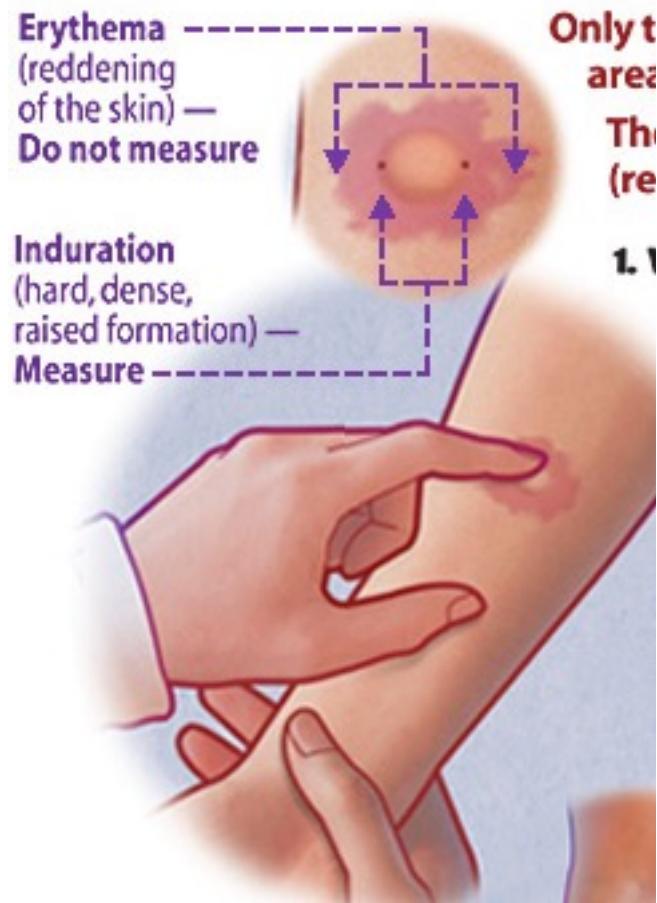


# Ipersensibilità di tipo IV

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)



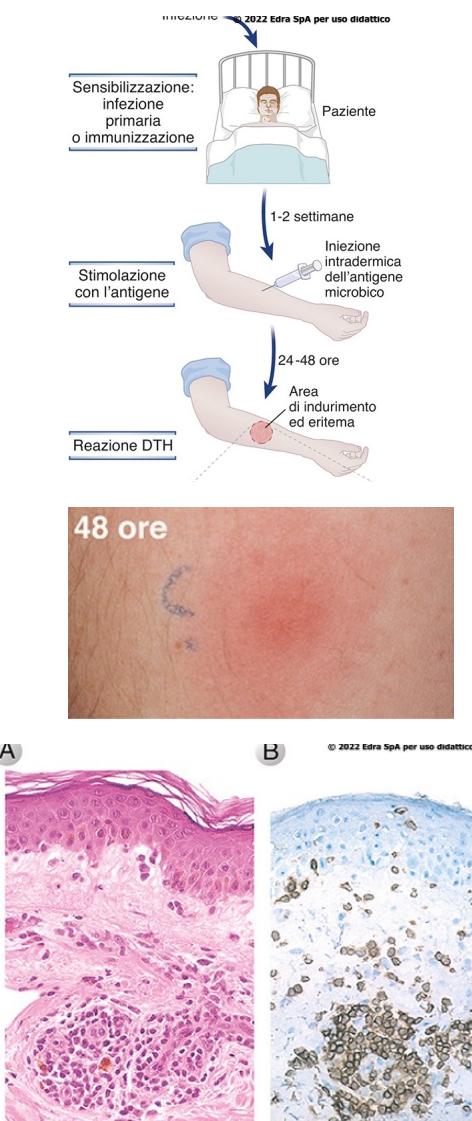
Un tipico esempio di reazione di ipersensibilità ritardata è rappresentato dal ponfo che si sviluppa in seguito al test di Mantoux o tuberculin skin test (TST) in individui che sono entrati in contatto con il *Mycobacterium tuberculosis*.

Questo test viene utilizzato per verificare in un individuo l'esistenza di una infezione da *M. tuberculosis* o un precedente contatto. Nel test viene iniettata, per via intradermica una piccola quantità di PPD (**un cocktail di antigeni micobatterici estratti dal bacillo tubercolare**) e 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.

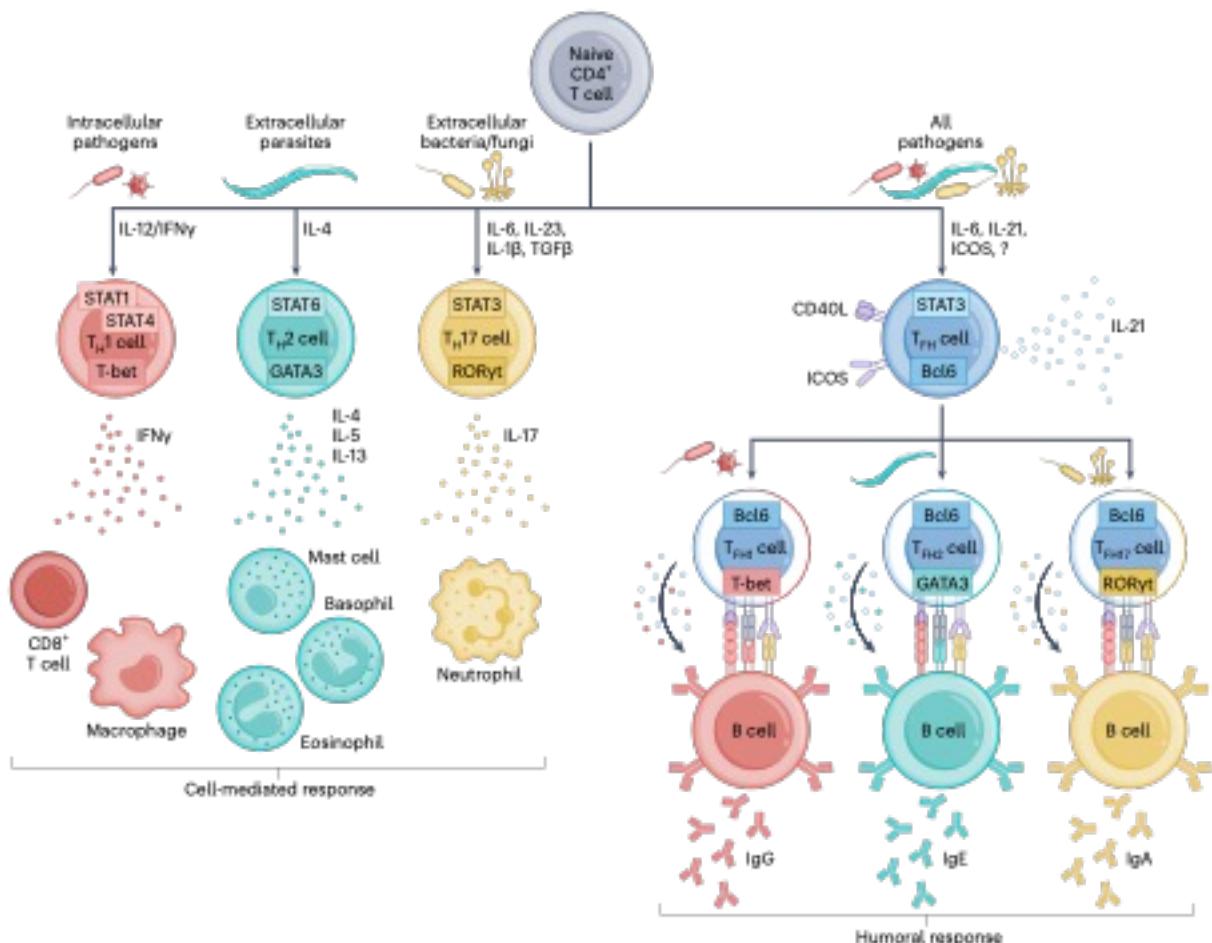
# Caratteristiche funzionali dei linfociti Th1



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 linfotossina 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

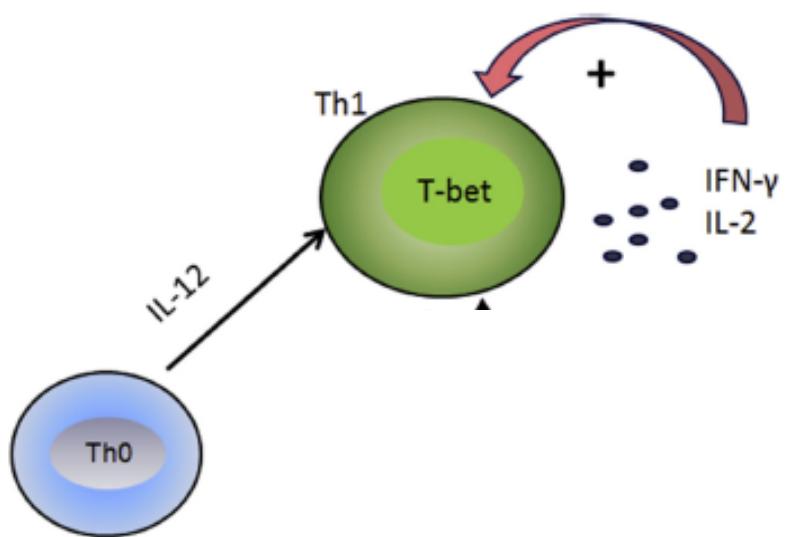
**Morfologia di una reazione da ipersensibilità ritardata.** Infiltrato perivascolare dermico di cellule mononucleate.

# Principali sottopopolazioni di linfociti T helper



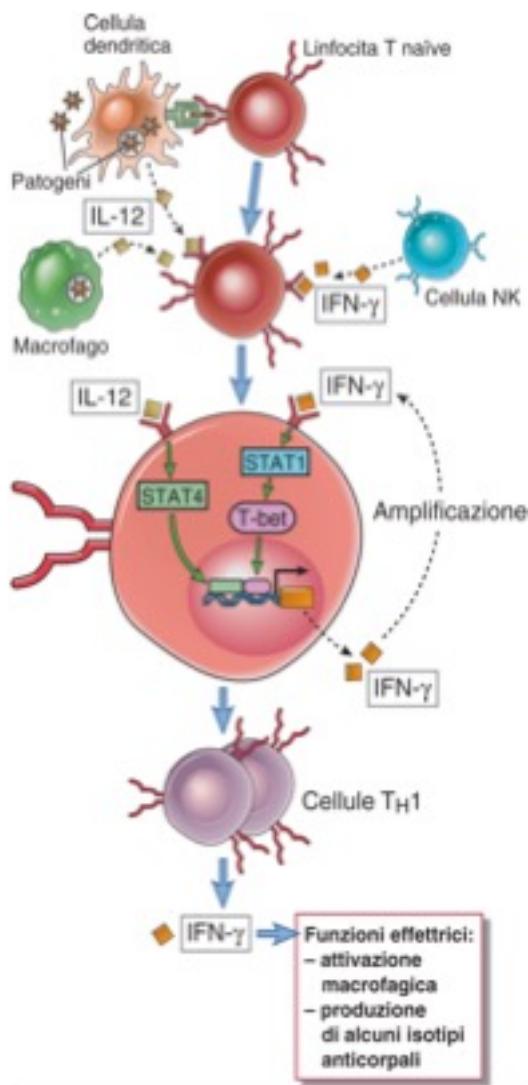
I linfociti T CD4+ differenziano in sottopopolazioni di linfociti specializzati nel sostenere le risposte cellulari o anticorpali. I patogeni intracellulari inducono risposte Th1 producenti IFN- $\gamma$ , che potenziano le funzioni dei macrofagi. I parassiti extracellulari inducono Th2 esprimenti GATA3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

# Caratteristiche dei linfociti Th1

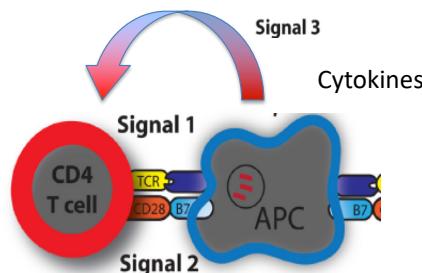


I linfociti Th1 esprimono il fattore trascrizionale T-bet. T-bet è il fattore trascrizionale che caratterizza i linfociti Th1. L' IFN- $\gamma$  e l' IL-12 inducono l'espressione di T-bet. T-bet regola direttamente la produzione di IFN- $\gamma$ . T-bet collabora con STAT-4 per indurre la produzione ottimale di IFN- $\gamma$ . I linfociti T CD4+ naive non esprimono T-bet.

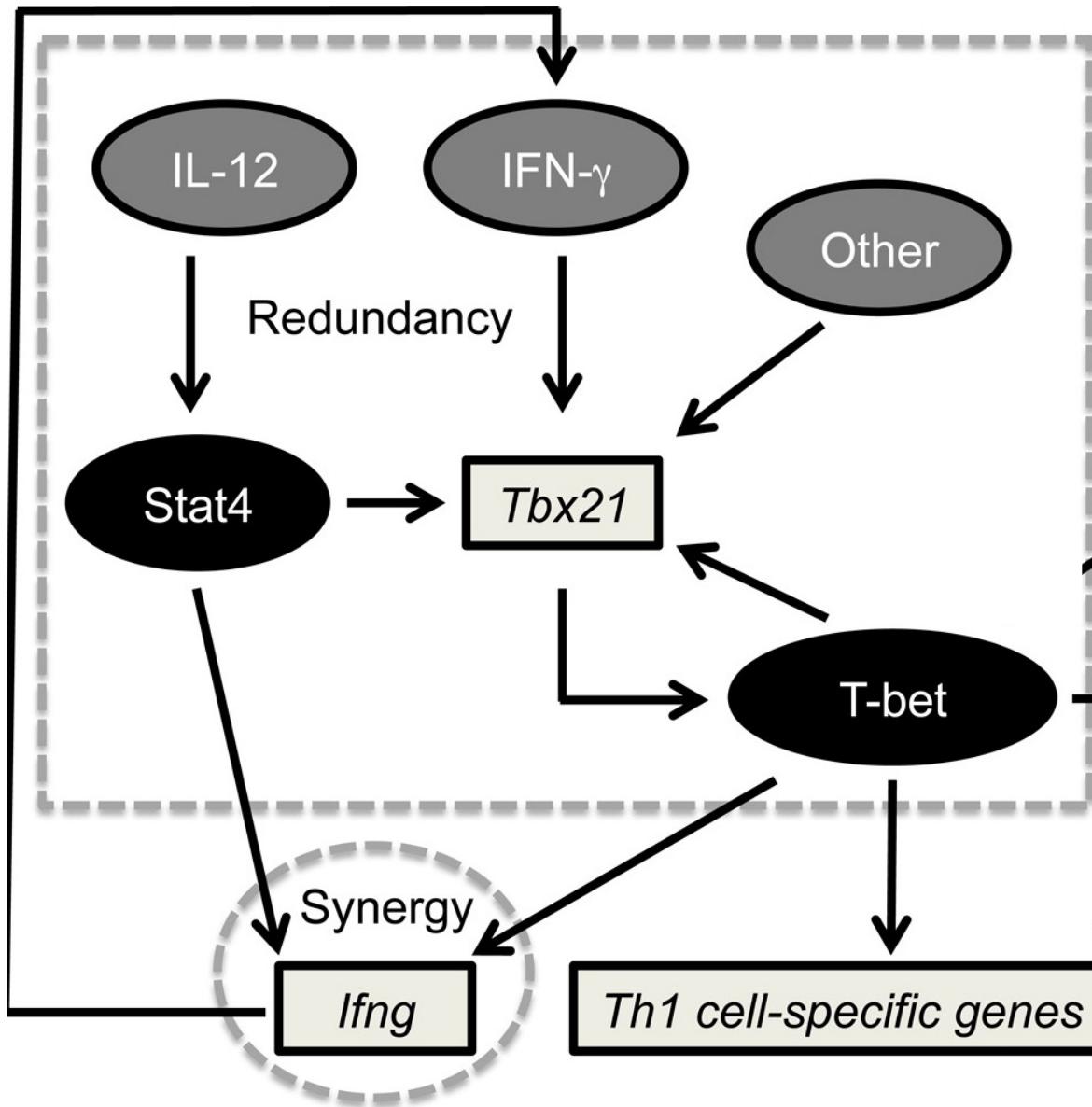
# Differenziamento dei linfociti Th1



L'IL-12 prodotta dalle cellule dendritiche in risposta ai batteri intracellulari e l'IFN- $\gamma$  prodotto dalle cellule NK attivano i fattori trascrizionali T-bet, STAT1 e STAT4. Questi fattori a loro volta indirizzano il differenziamento dei T CD4+ naive verso Th1. L'IFN- $\gamma$  prodotto dagli stessi Th1 amplifica questa risposta e inibisce lo sviluppo dei linfociti Th2 e Th17. La stimolazione da parte dell'IFN- $\gamma$  attraverso l'attivazione di STAT1 induce nella cellula T l'espressione di T-bet che induce la produzione di IFN- $\gamma$  e l'espressione del recettore per l'IL-12. L'IL-12 attraverso l'attivazione di STAT4 collabora con T-bet nella produzione di IFN- $\gamma$  ed è necessaria per il completo differenziamento dei Th1.



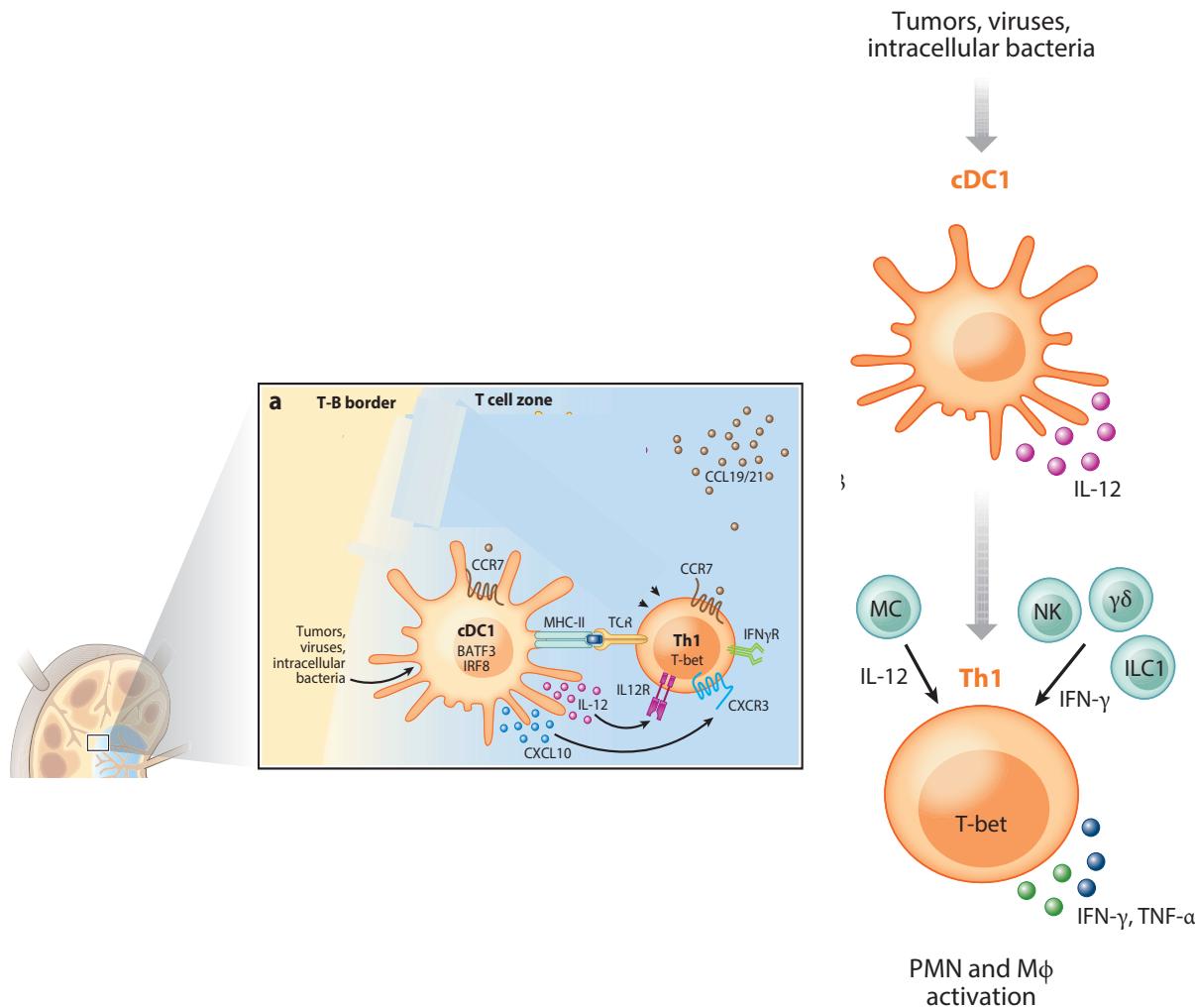
## Il fattore trascrizionale T-bet è indotto da IL-12 e da IFN- $\gamma$



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

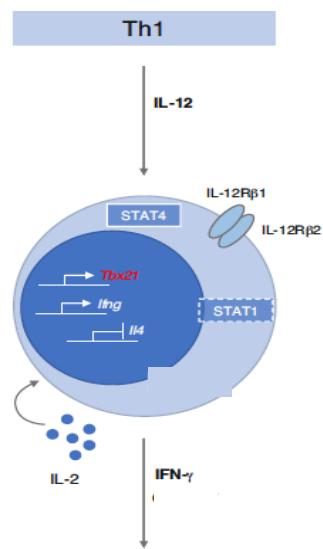
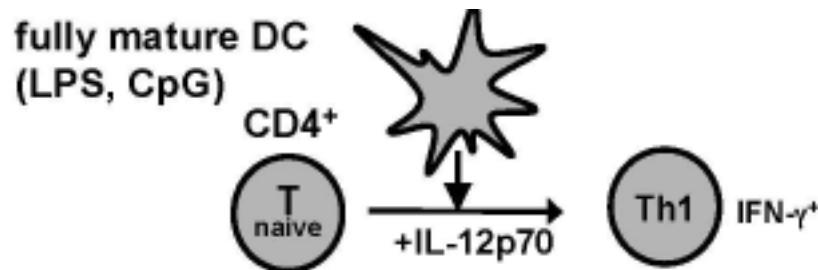
- IL-12 and IFN- $\gamma$  sono ridondanti nell'indurre T-bet nelle cellule T in vitro e in vivo
- La segnalazione dipendente da IFN- $\gamma$  non è indispensabile per generare linfociti T produttori IFN- $\gamma$
- T-bet promuove la propria espressione quando è indotto dall'IL-12 o dall'IFN- $\gamma$ .
- T-bet collabora con STAT4 nella produzione di IFN- $\gamma$

# 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.

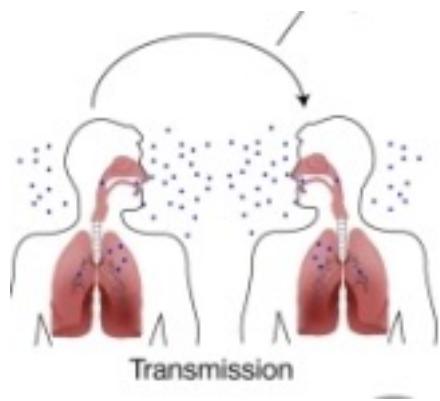
Una caratteristica in comune fra tutte queste infezioni è la stimolazione di cellule dell'immunità innata producenti IL-12. La produzione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche è considerata l'evento critico nella polarizzazione delle cellule T naive in Th1.

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*



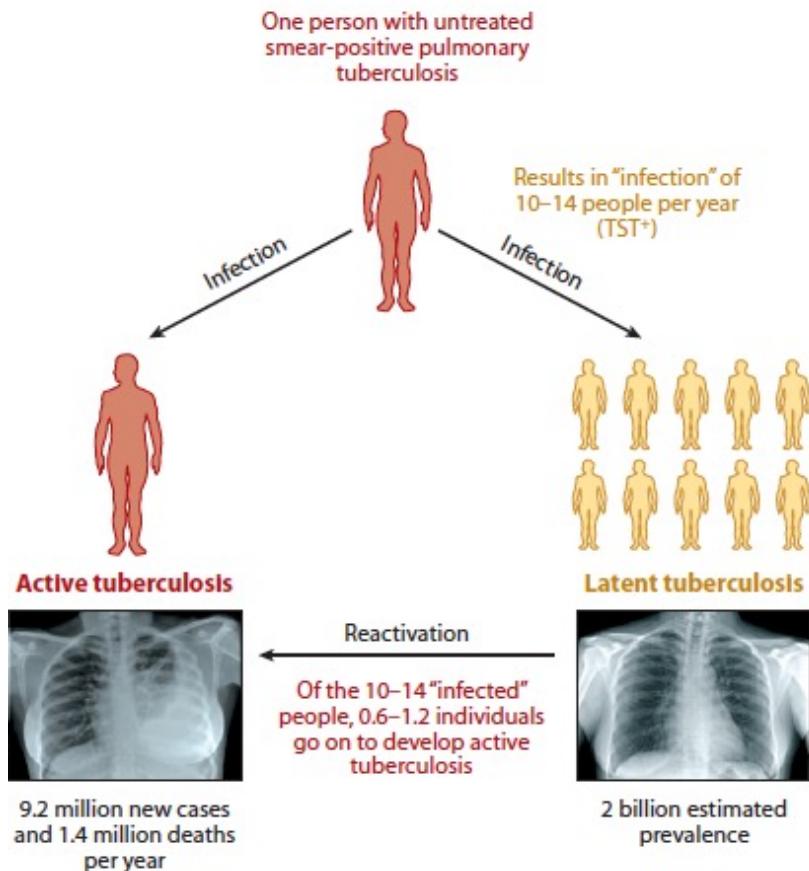
La tubercolosi è causata dall'infezione da parte di *M. tuberculosis*.

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.

La tubercolosi è la prima causa di morte fra le malattie infettive nel mondo.

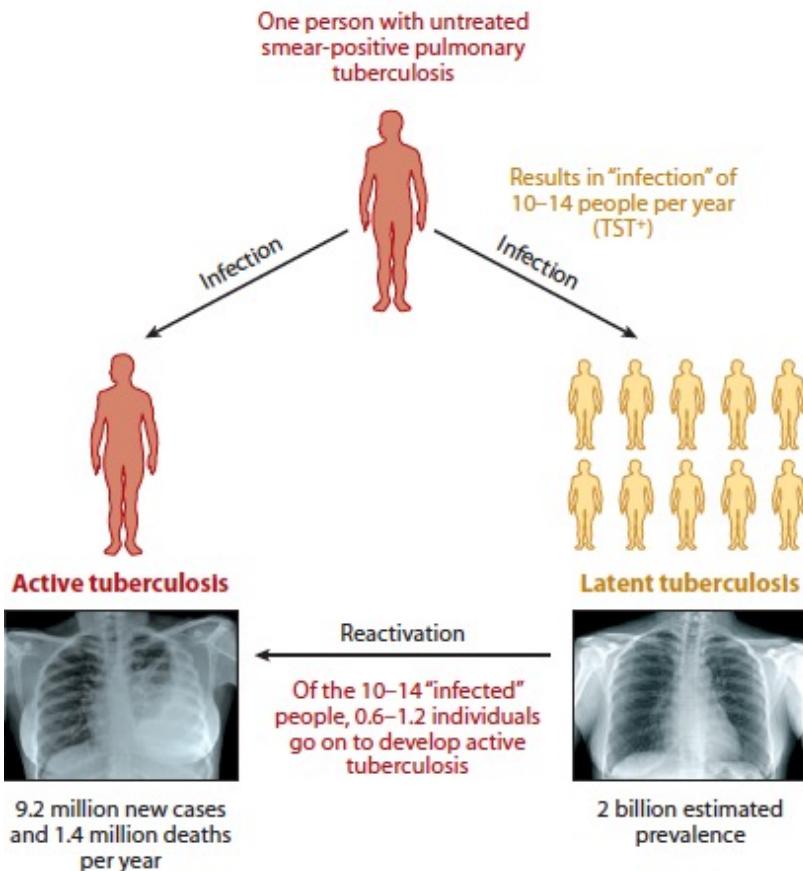
# Epidemiologia dell'infezione da *M. tuberculosis*



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

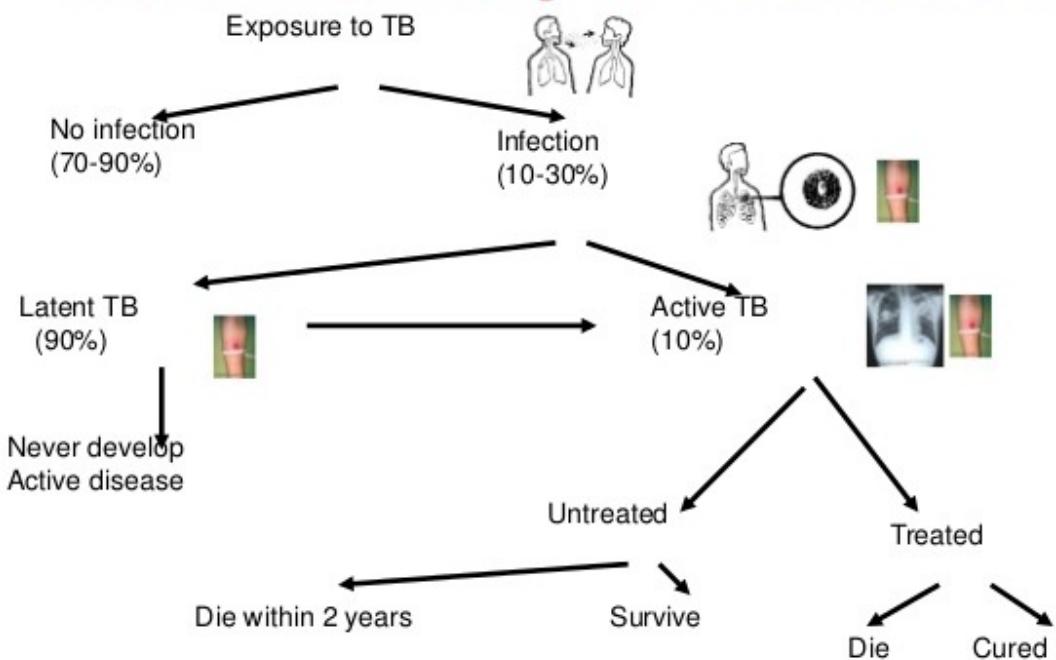
La malattia è nella maggior parte dei casi polmonare (70%) ma può essere disseminata ad altri organi quali i linfonodi, le ossa, le meningi. L'infezione da parte di *M. tuberculosis* può evolvere in: i) malattia attiva e sintomatica II) malattia latente e asintomatica. La prima è caratterizzata da febbre, 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



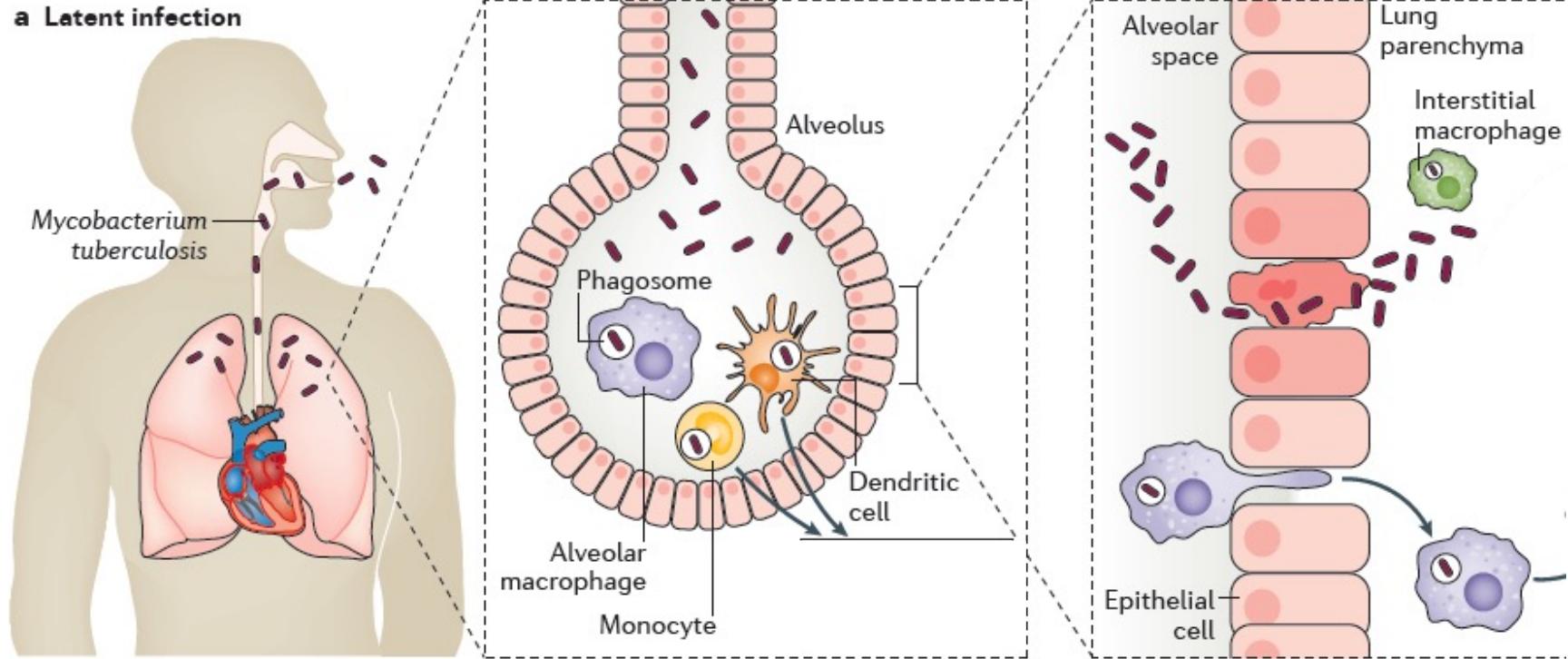
L'infezione da *M. tuberculosis* può evolvere in:

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, rafampicina, pirazinamide, etambutolo per 6 mesi. Resistenza a tutti i farmaci può avvenire.

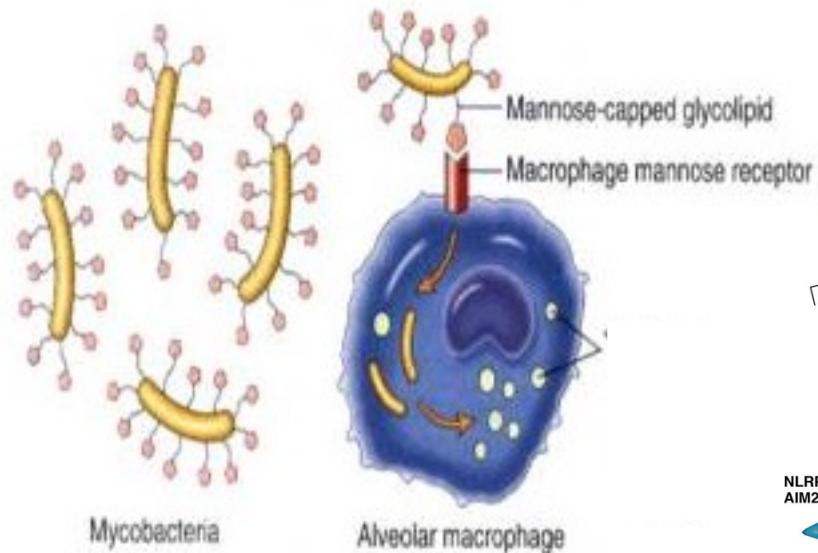
# Fasi iniziali dell'infezione da *M. tuberculosis*



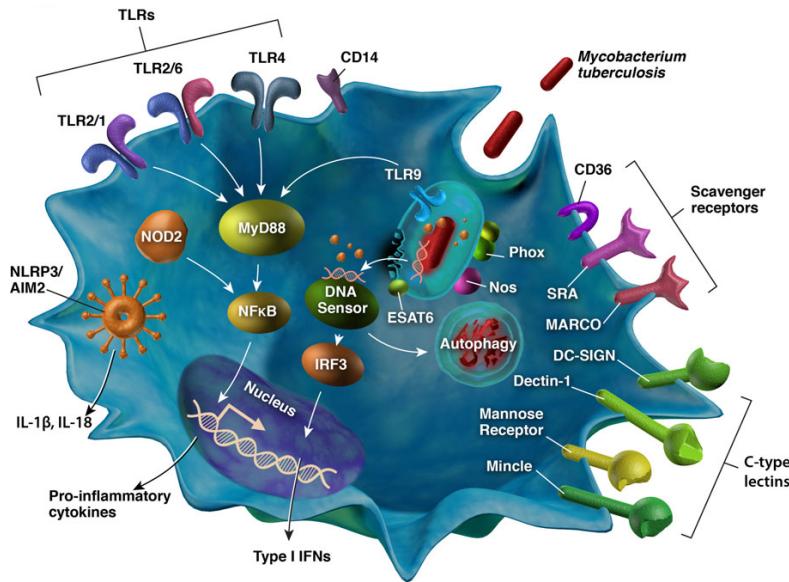
L'infezione ha inizio quando il micobatterio raggiunge gli alveoli dove incontra i macrofagi alveolari. Se questa prima linea di difesa non riesce ad eliminare il batterio, i macrofagi infettati dopo circa due settimane dall'infezione si localizzano nello spazio interstiziale del polmone. L'accesso del 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 SRs	<i>M. tuberculosis</i> ligand(s)	Comment
Class A (SR-A1, MARCO) Class B (CD36, SR-B1)	Unknown	SRs display broad ligand-binding ability; ligands include lipoproteins, polyanionic molecules, gram-positive and gram-negative bacteria
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*

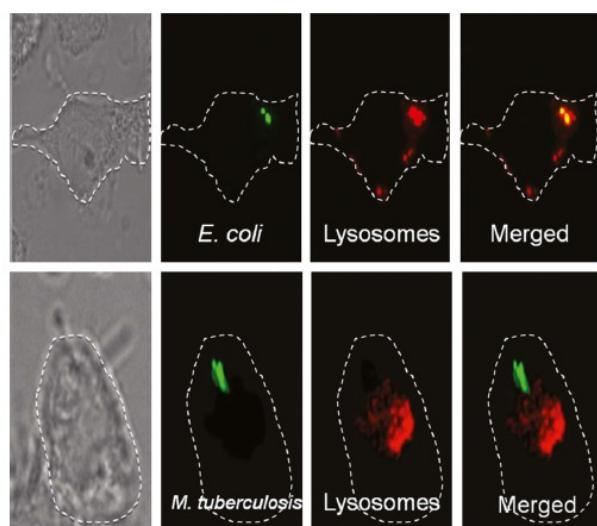
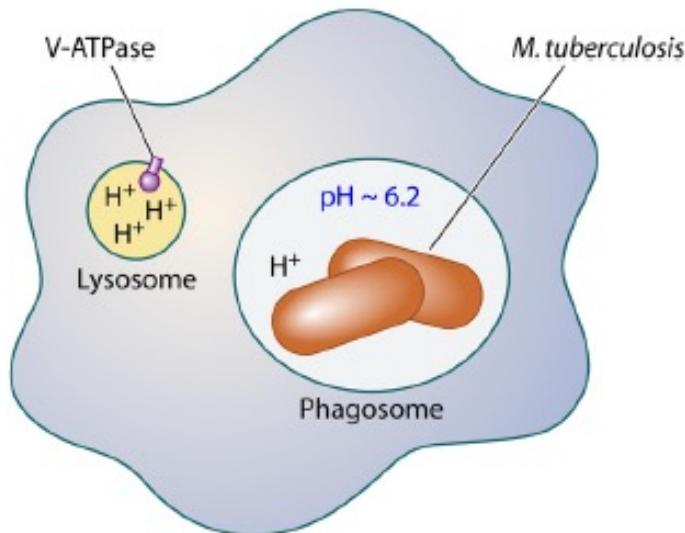
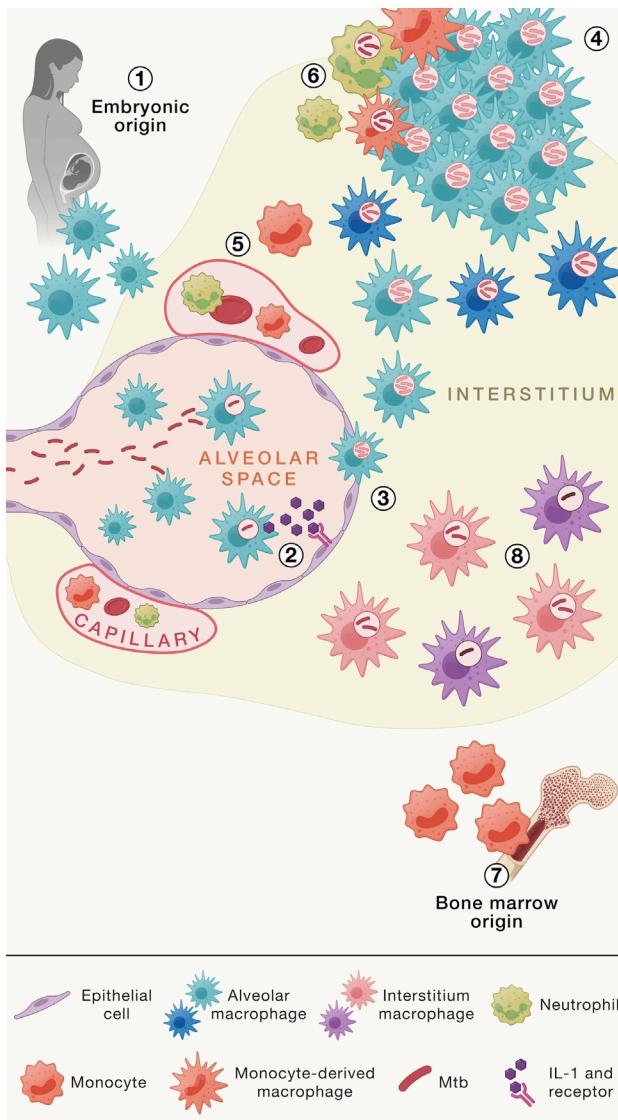


Fig. 2. Confocal microscopy of THP-1 macrophages infected with *E. coli* or *Mtb*. Localization of *E. coli* or *Mtb* with lysosomes is detected with immunofluorescence staining. Lysosomes are stained with Lysotracker Red dye (Red), and bacteria are labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (green) 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.

*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.

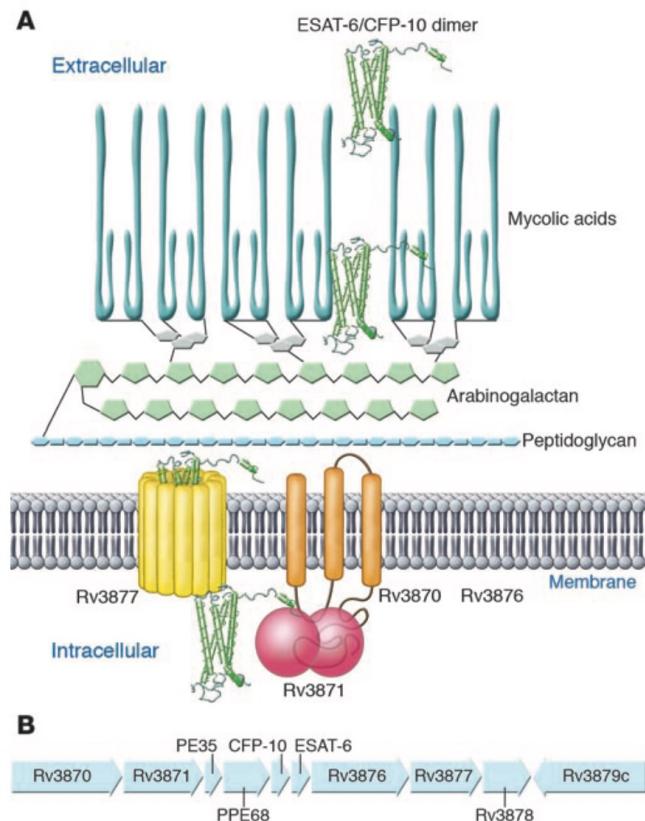
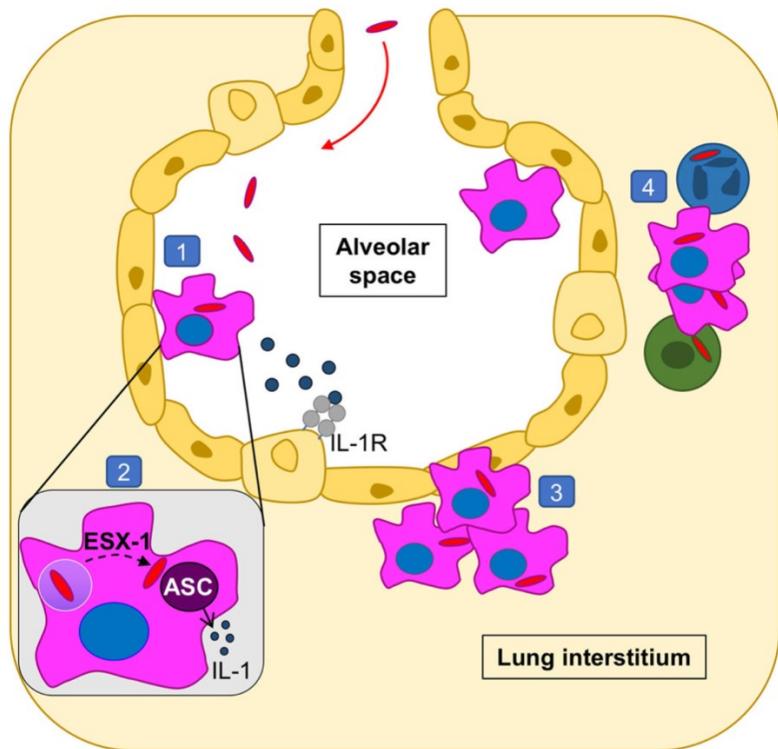
## Interazione fra M.tuberculosis e macrofagi



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

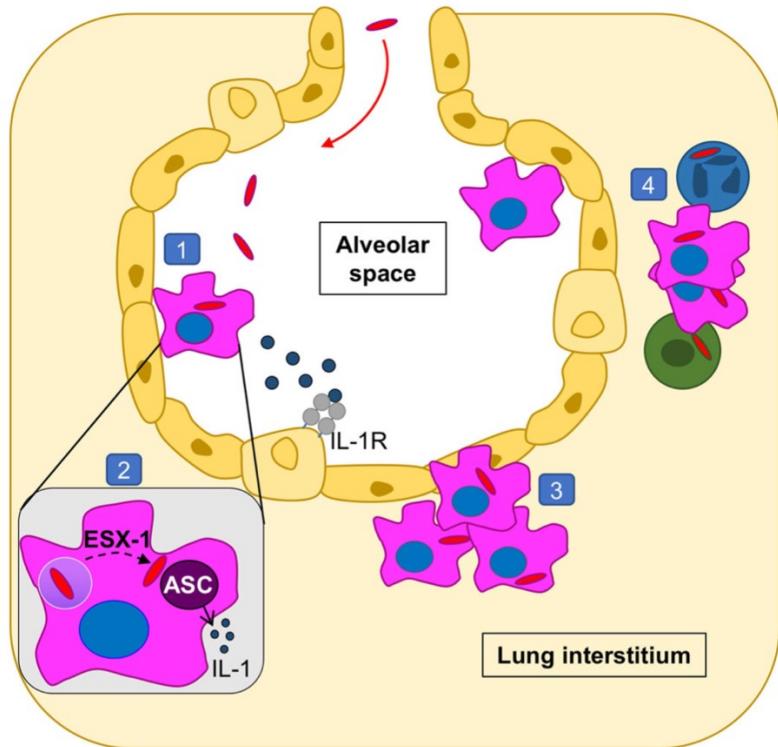
Dopo circa due settimane dall'infezione i macrofagi infettati traslocano nell'interstizio polmonare e attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie richiamano altre cellule residenti (macrofagi interstiziali, cellule dendritiche) o circolanti (neutrofili e monociti).

# Il passaggio dei macrofagi alveolari infettati da *M. tuberculosis* nell'interstizio polmonare dipende dall'IL-1 $\beta$ e dal sistema di secrezione di tipo VII del micobatterio



RD1 (region of difference 1) è un locus di virulenza che codifica per un sistema di secrezione di tipo VII denominato ESX1 responsabile dell'esporto delle proteine CFP-10 e ESAT-6.

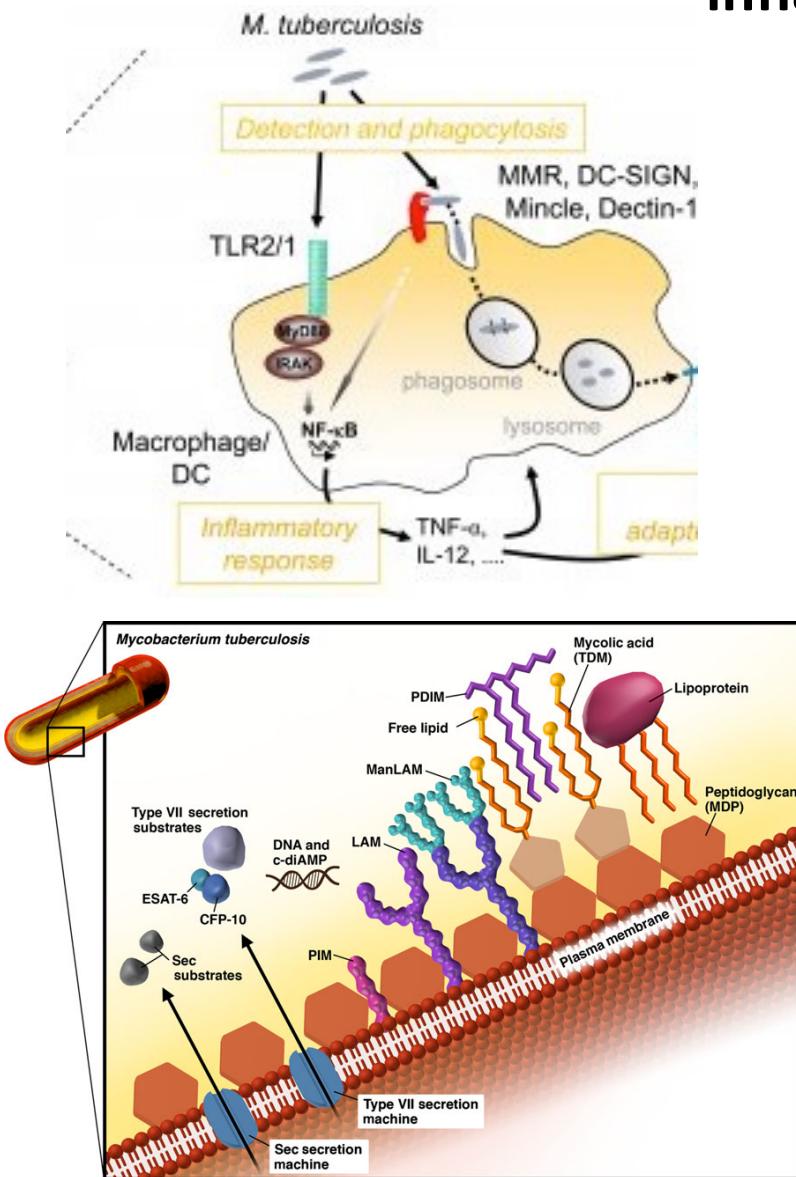
# Il passaggio dei macrofagi alveolari infettati da *M. tuberculosis* nell'interstizio polmonare dipende dall'IL-1 $\beta$ e dal sistema di secrezione di tipo VII del micobatterio



ESX-1 attraverso l'attivazione dell'inflammasoma induce la secrezione di IL-1 $\beta$  da parte dei macrofagi.

L'IL-1 $\beta$  agendo sulle cellule epiteliali permette il passaggio dei macrofagi infettati dall'alveolo all'interstizio polmonare.

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

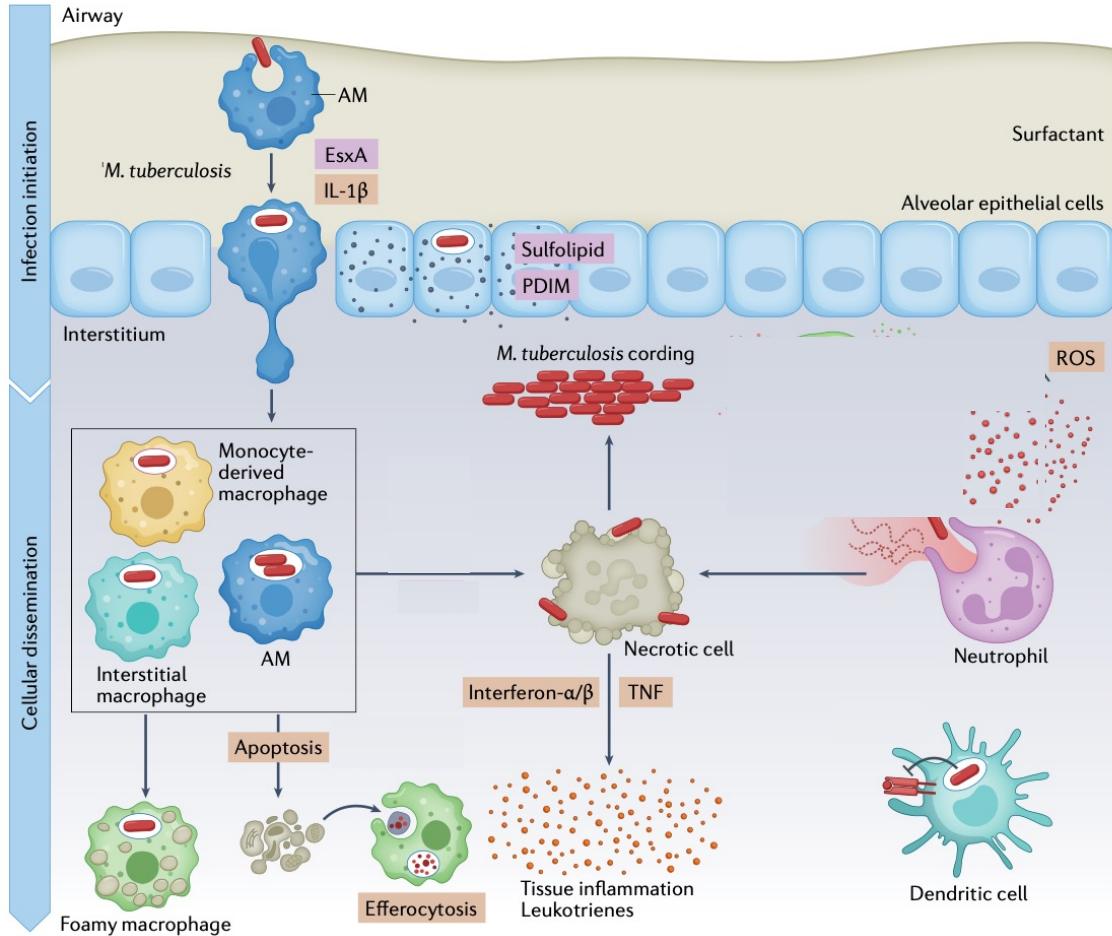


Nell'interstizio polmonare *M. tuberculosis* stimola una più forte risposta infiammatoria infettando i macrofagi le cellule dendritiche. Le lipoproteine di *M. tuberculosis* attivano i macrofagi a produrre citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-12 e chemochine).

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 (neutrofili e monociti) dal circolo.

# Localizzazione del micobatterio nell'interstizio polmonare

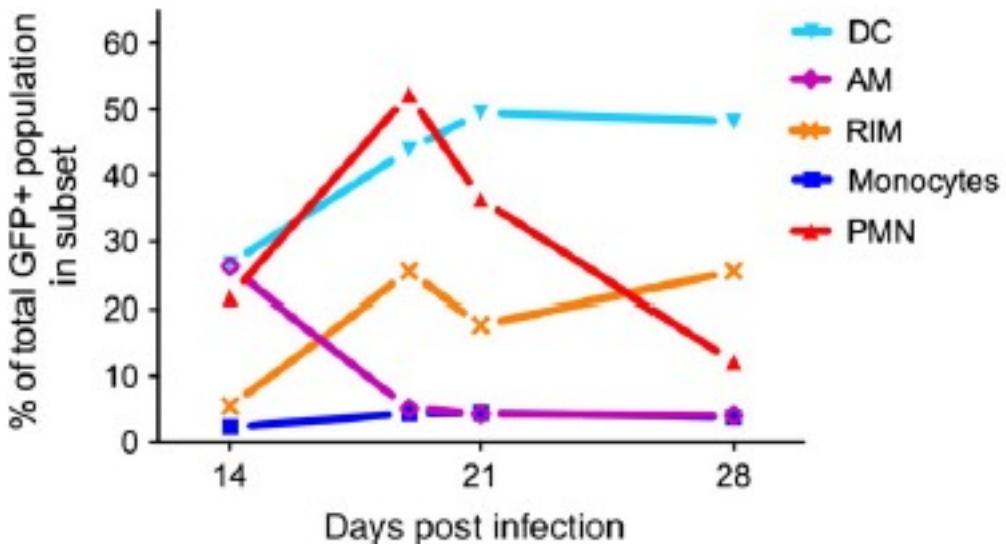


Nell'interstizio polmonare *M. tuberculosis* diversifica la sua nicchia di sopravvivenza ed infetta sia i macrofagi interstiziali che i macrofagi derivati dai monociti, le cellule dendritiche e i neutrofili.

*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 (monociti) da inizio al granuloma.

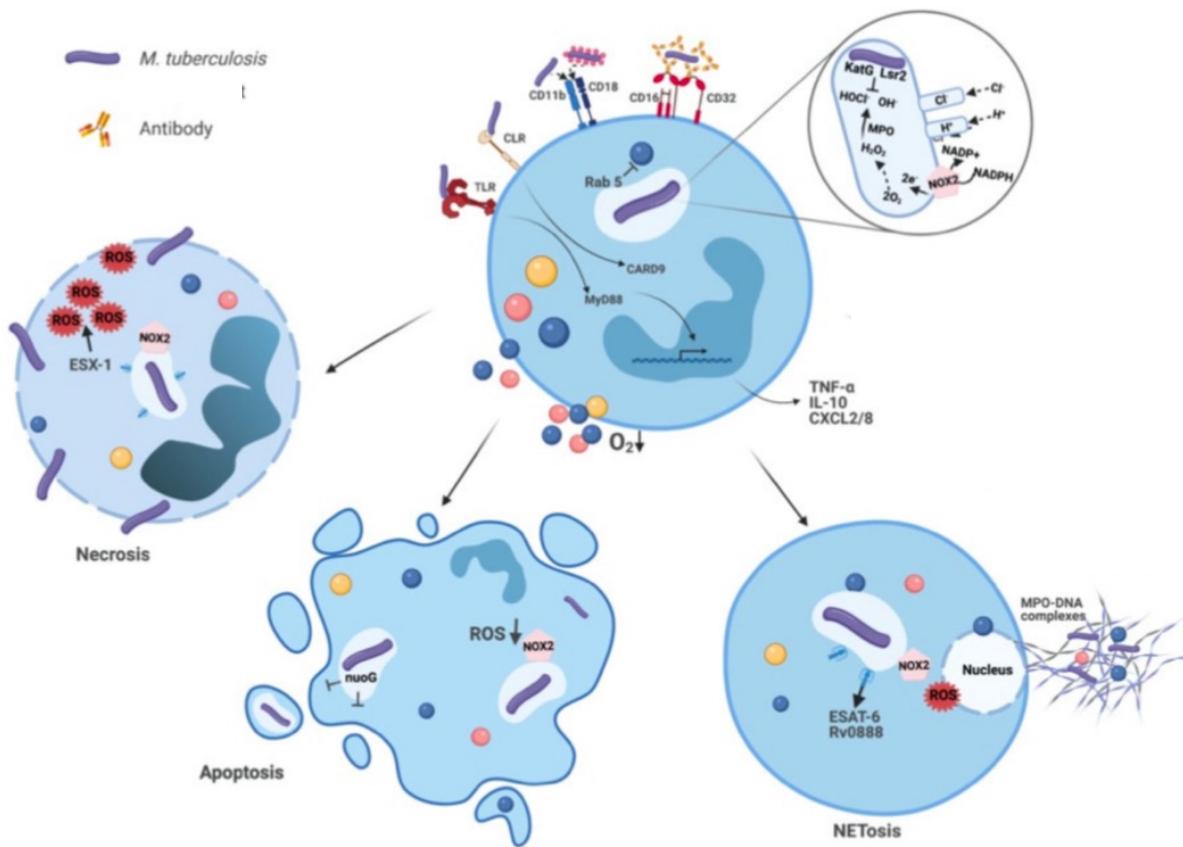
# Popolazioni cellulari infettate da *M. tuberculosis* nel tempo



**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* esprimente la proteina GFP (green fluorescent protein) hanno dimostrato che *M. tuberculosis* risiede oltre che nei macrofagi anche nelle cellule dendritiche e nei neutrofili.

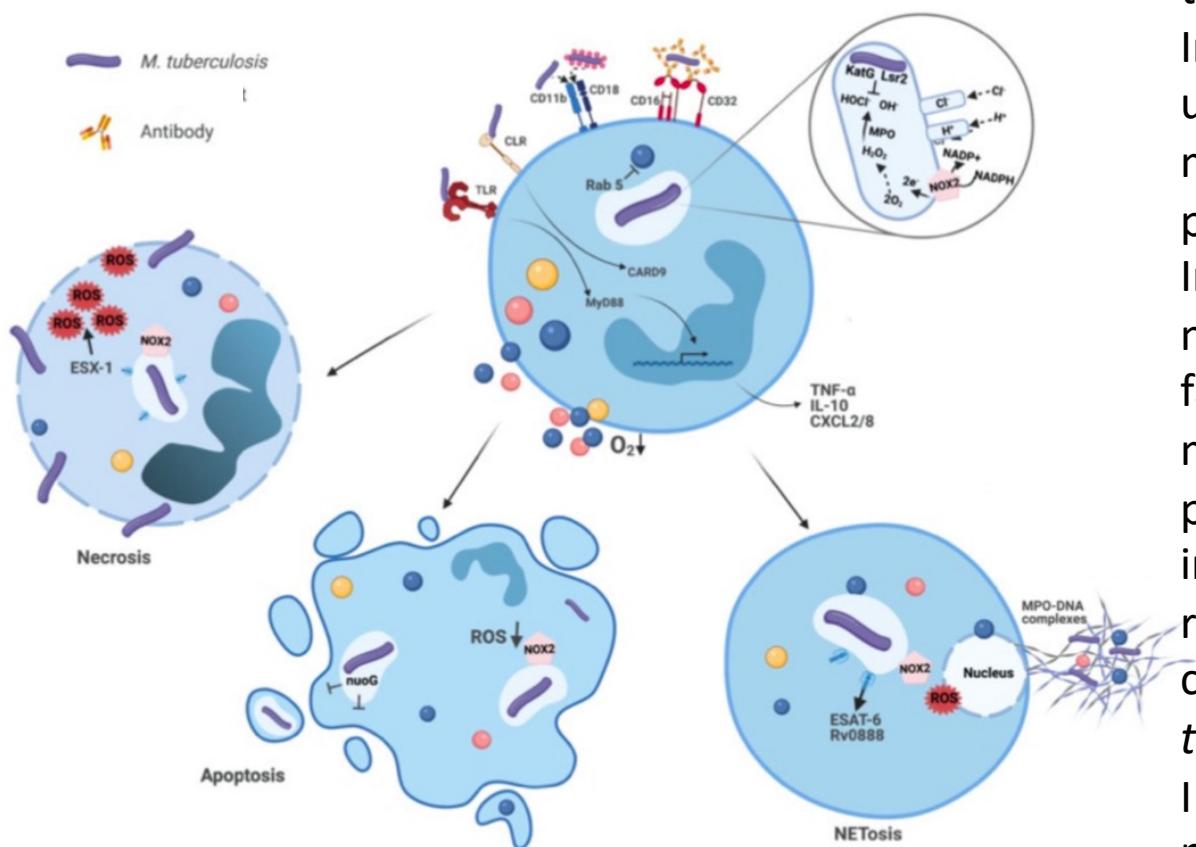
# Ruolo dei neutrofili nell'infezione da M. tuberculosis



*M. tuberculosis* è captato da parte dei neutrofili attraverso l'Fc $\gamma$ R, il CR1 o i recettori scavenger.

Il riconoscimento da parte dei PRR quali i TLR, NOD attiva la via dinsegnalazione intracellulare che determina l'attivazione di NF- $\kappa$ B che media la trascrizione dei geni per il TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  promuovendo il processo infiammatorio.

# Ruolo dei neutrofili nell'infezione da *M. tuberculosis*



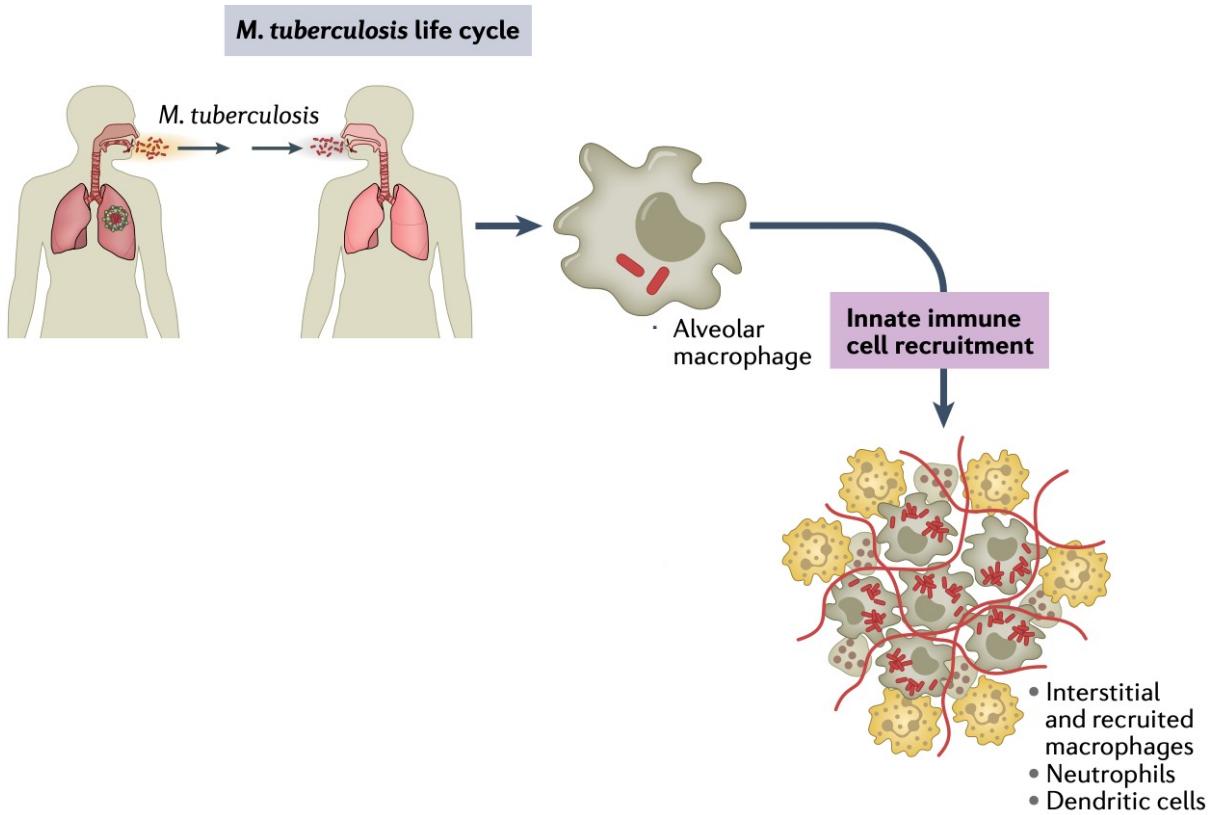
*M. tuberculosis* è resistente alla uccisione da parte dei neutrofili, non essendo sensibile ai ROS e ai NET (neutrophil extracellular trap).

In generale i neutrofili hanno una ridotta attività antimicrobica ma sono associati alla progressione della malattia.

In particolare la morte per necrosi dei neutrofili infettati favorisce il rilascio del micobatterio nel tessuto permettendo l'ulteriore infezione di altri macrofagi che rappresentano la nicchia cellulare preferenziale di *M. tuberculosis*.

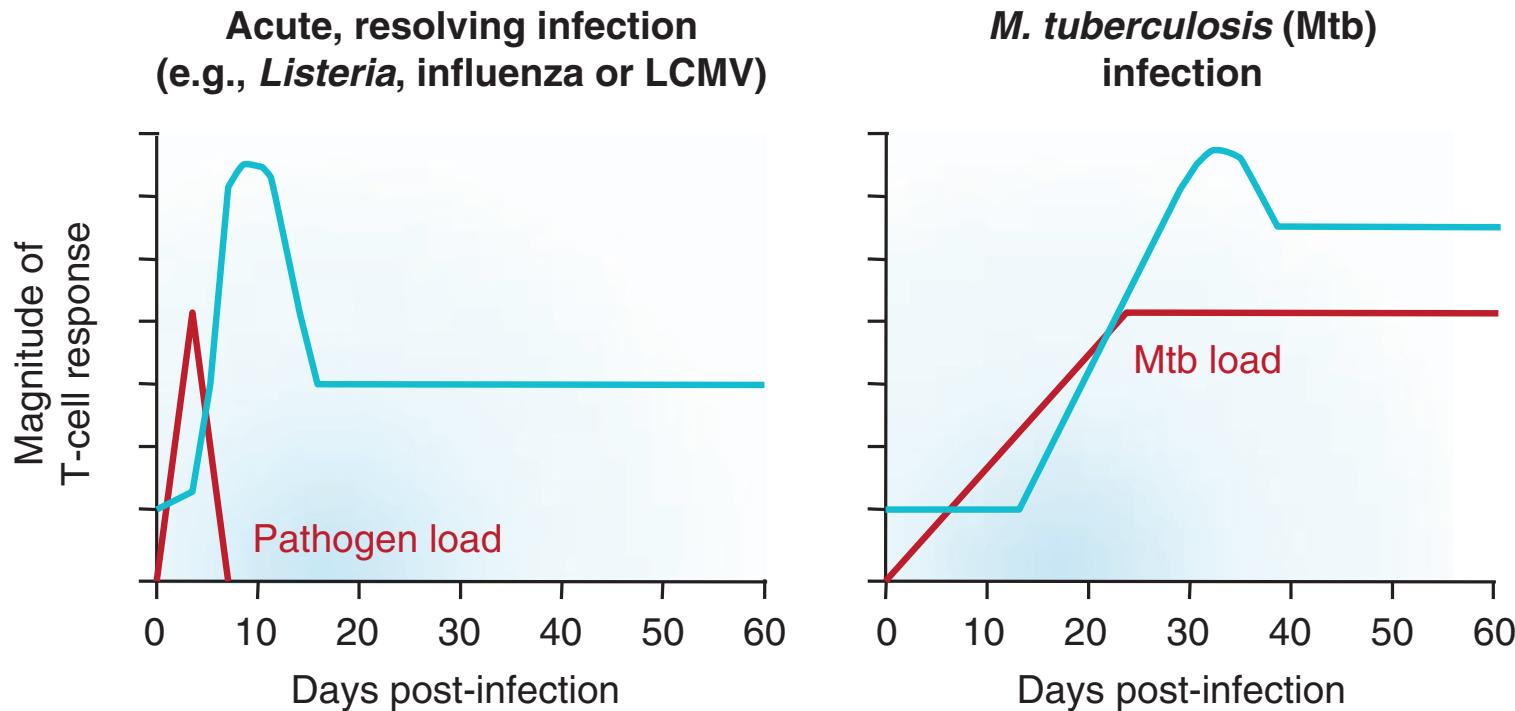
I neutrofili contribuiscono alla progressione della malattia perché danneggiano il tessuto attraverso il rilascio di ROS, e enzimi di degradazione.

## Fase iniziale nella formazione del granuloma tubercolare



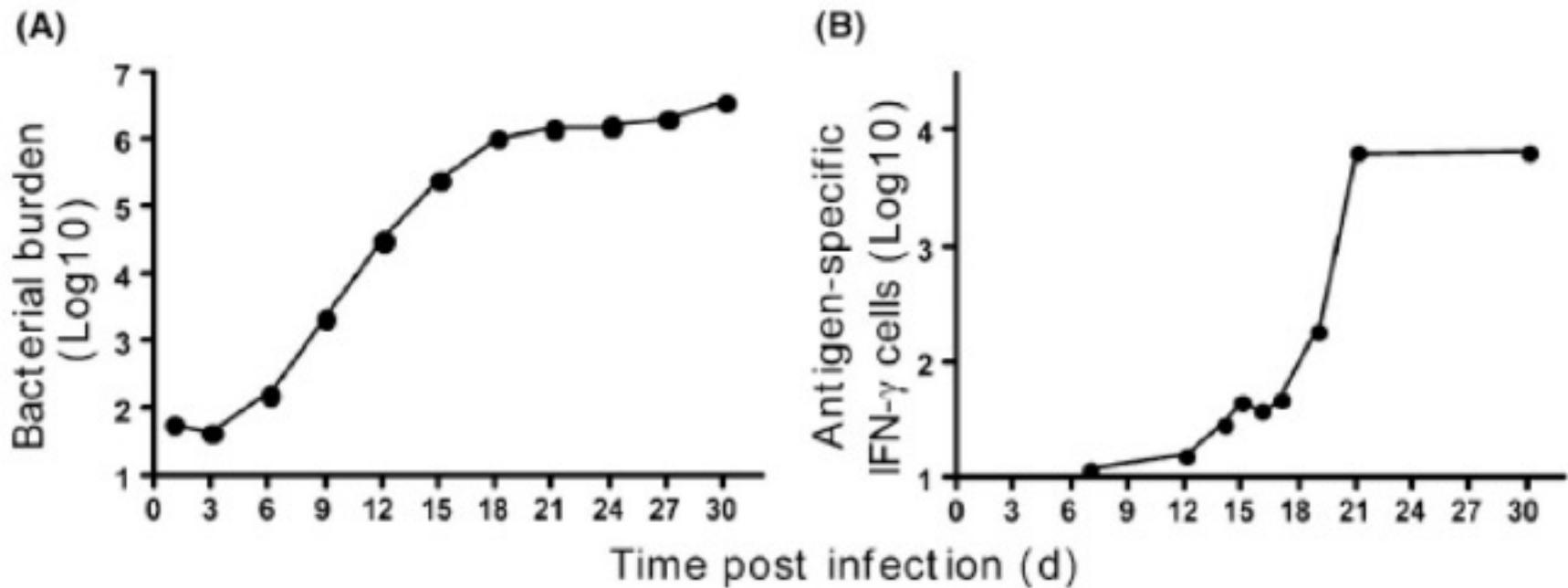
I macrofagi infettati nell'interstizio polmonare richiamano altri leucociti dal circolo favorendo l'infezione di altre cellule. L'agglomerato di macrofagi neutrofili e cellule dendritiche rappresenta l'inizio del granuloma.

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



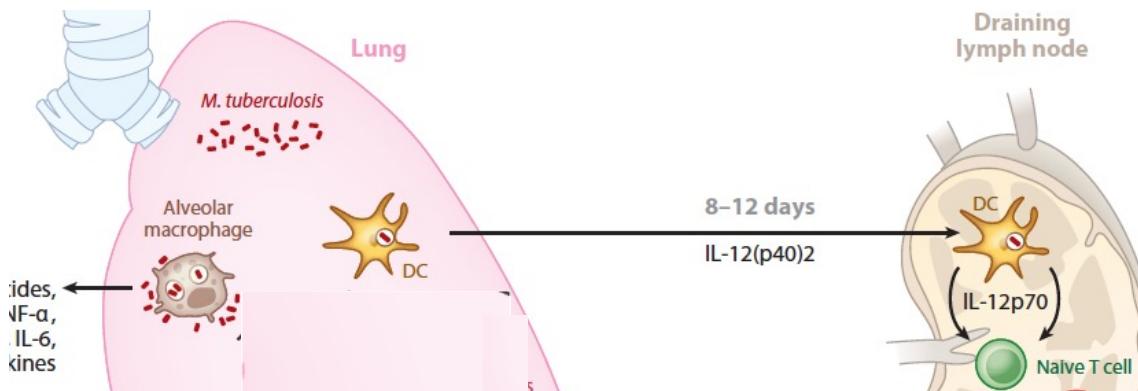
Nelle infezioni acute, autolimitanti le risposte T hanno inizio 3-5 giorni dopo l'infezione e raggiungono la massima intensità dopo 7-8 giorni; dopo l'infezione da *M. tuberculosis* le risposte T hanno inizio dopo più di 10 giorni e raggiungono i livelli massimi dopo 30-40 giorni. Per effettuare la diagnosi 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



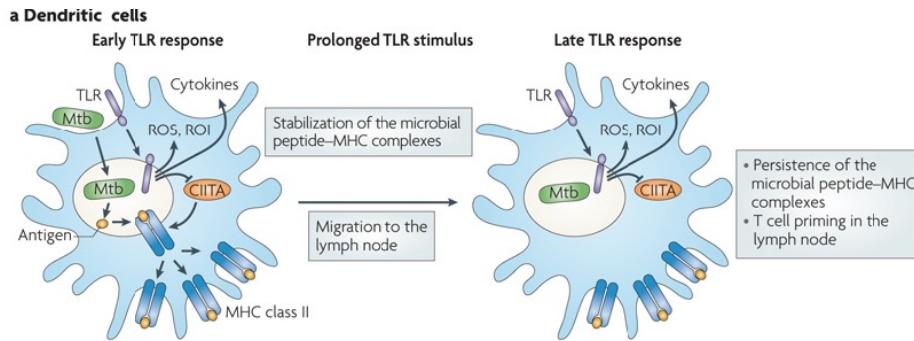
La risposta immune adattativa, rappresentata dalla generazione di linfociti Th1 è necessaria per contenere l'infezione da *M. tuberculosis*. La risposta Th1 può essere evidenziata dopo 2-8 settimane dall'infezione con il micobattterio.

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



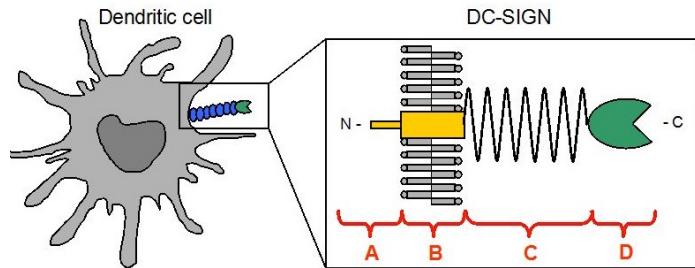
L'attivazione della risposta immune adattativa verso *M. tuberculosis* avviene nei linfonodi. Esperimenti effettuati somministrando via aerosol *M. tuberculosis* esprimente la GFP ai topi hanno dimostrato che le cellule dendritiche nei linfonodi sono responsabili della attivazione dei linfociti T.

# Induzione della risposta immune adattativa al Micobatterio della tubercolosi



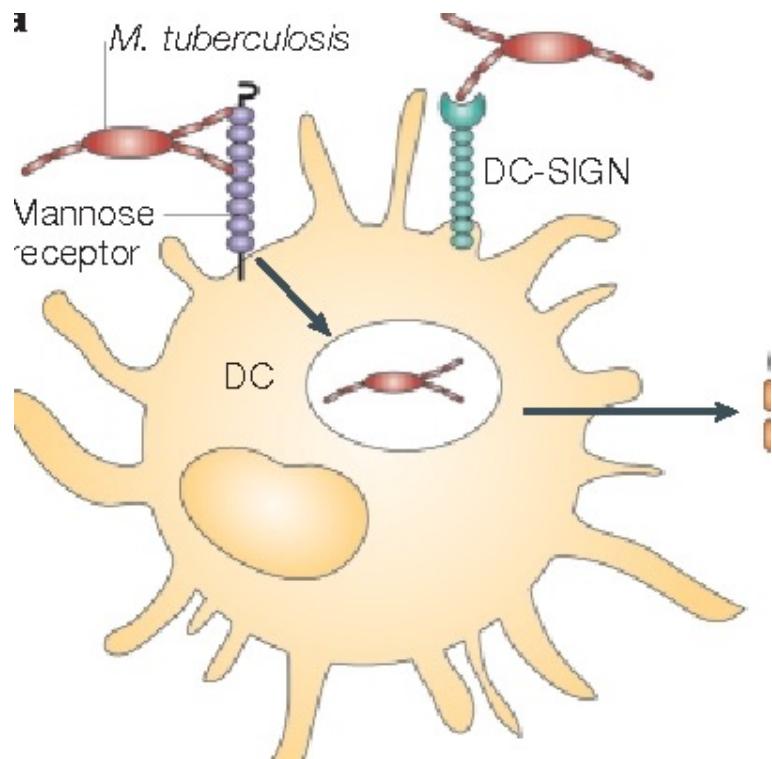
L'attivazione della risposta T diretta verso il *M. tuberculosis* avviene a livello dei linfonodi ad opera delle cellule dendritiche che dal polmone migrano nel linfonodo.

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)

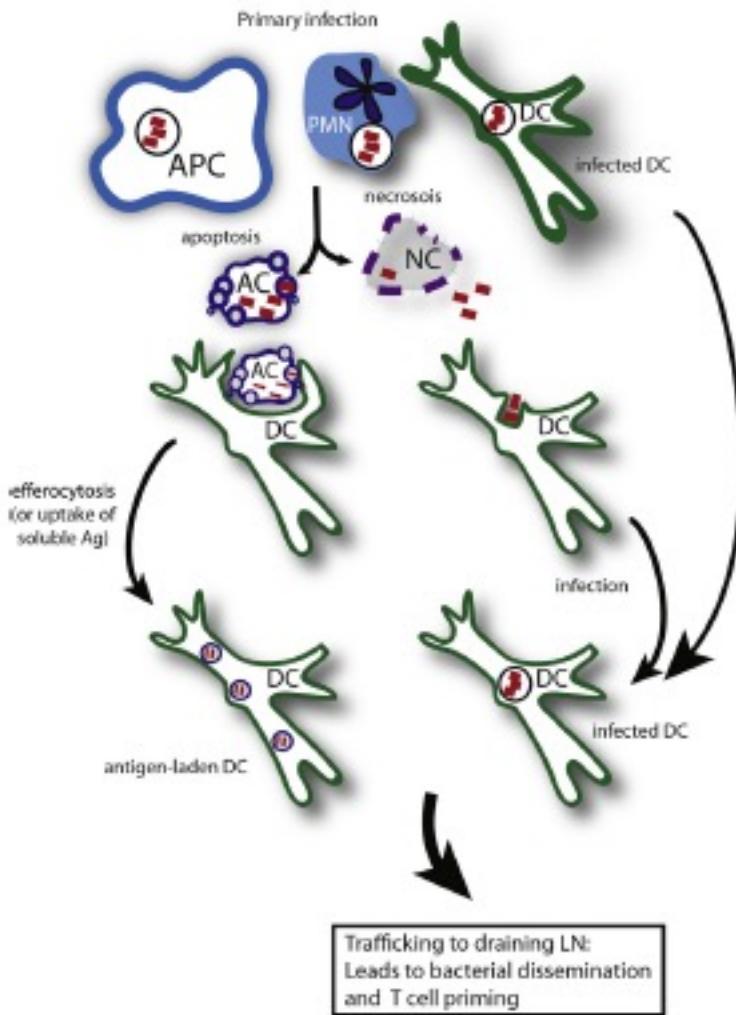
## La fagocitosi di *M.tuberculosis* inibisce la capacità delle DC di migrare nel linfonodo



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 (lipoarabinomannano) e il DC-SIGN C.type lectin 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.

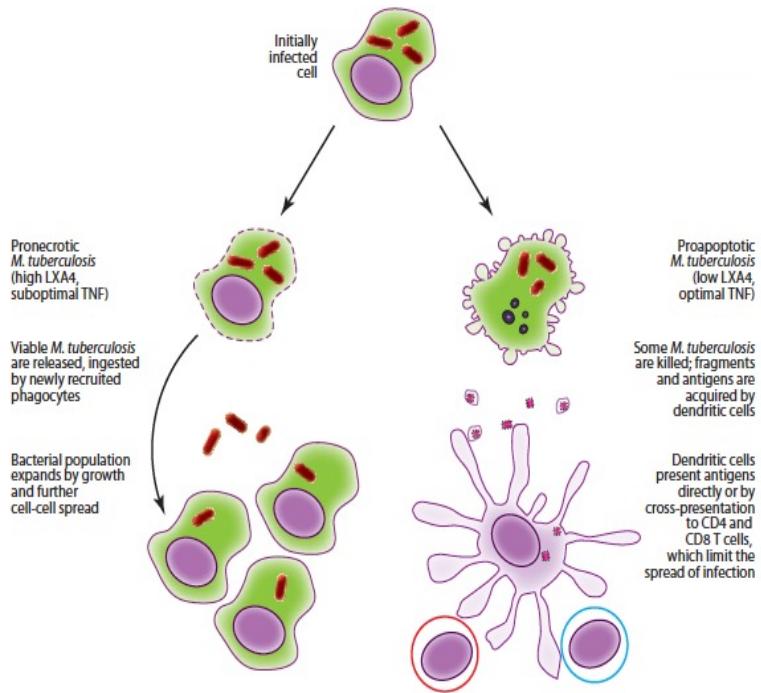
## Le cellule dendritiche infettate o che hanno acquisito il Micobatterio dalle cellule apoptotiche migrano nel linfonodo dove attivano i linfociti T



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

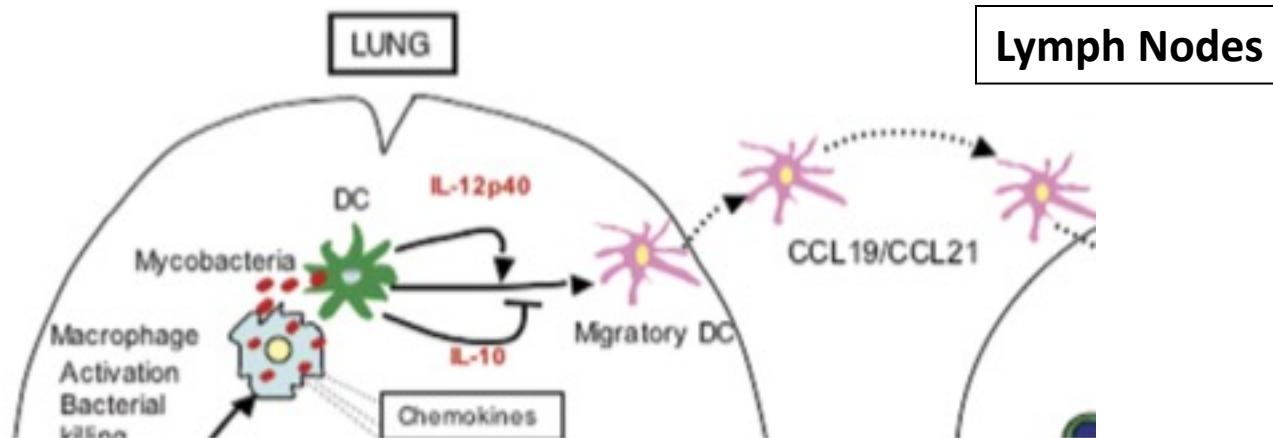
# Diversi pathways di morte cellulare delle cellule infettate da M. tuberculosis

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*



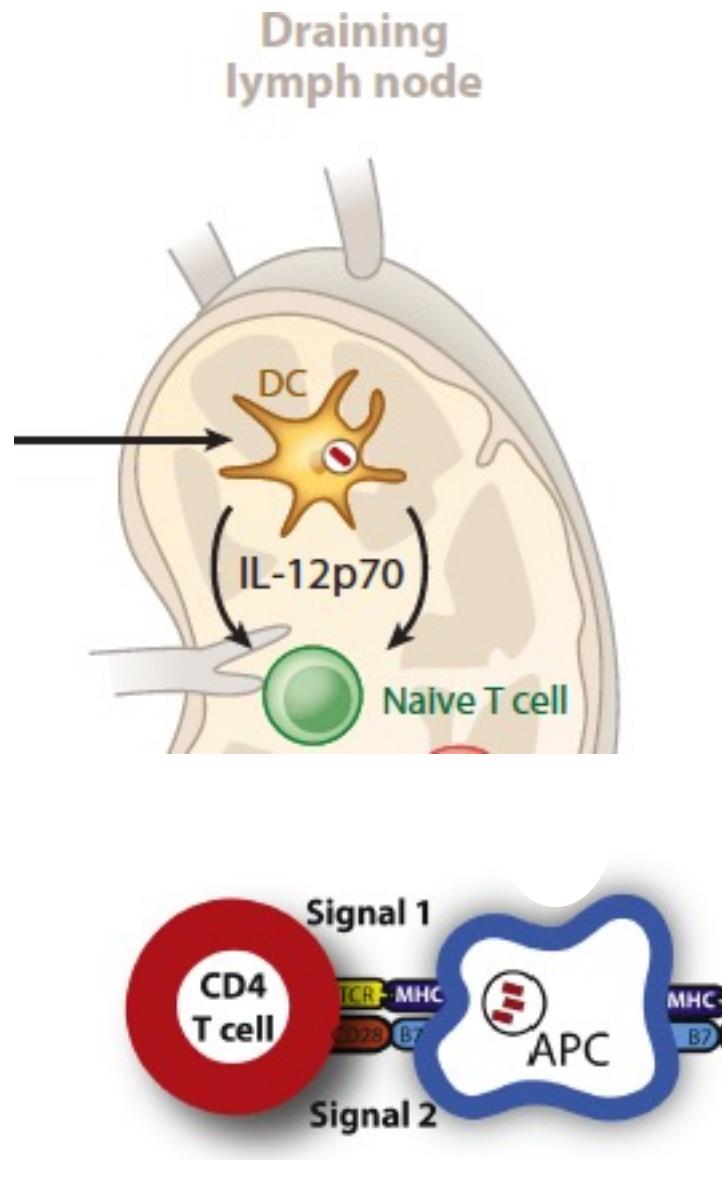
Batteri antiapoptotici e pronecrotici sono rilasciati dalle cellule morenti e sono fagocitati dai macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche circostanti diffondendo l'infezione. Batteri proapoptotici sono parzialmente uccisi nelle cellule in apoptosi e i costituenti cellulari sono captati dalle cellule dendritiche e presentati efficientemente 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*

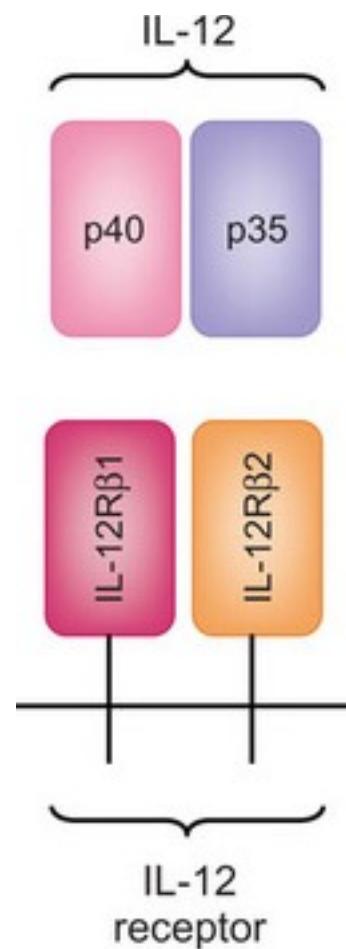


I topi plt che non esprimono le chemochine CCL19/CCL21 (ligandi del CCR7) infettati per via aerosol da *M. tuberculosis* presentano una riduzione del 95% di batteri e di DC nei linfonodi.

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

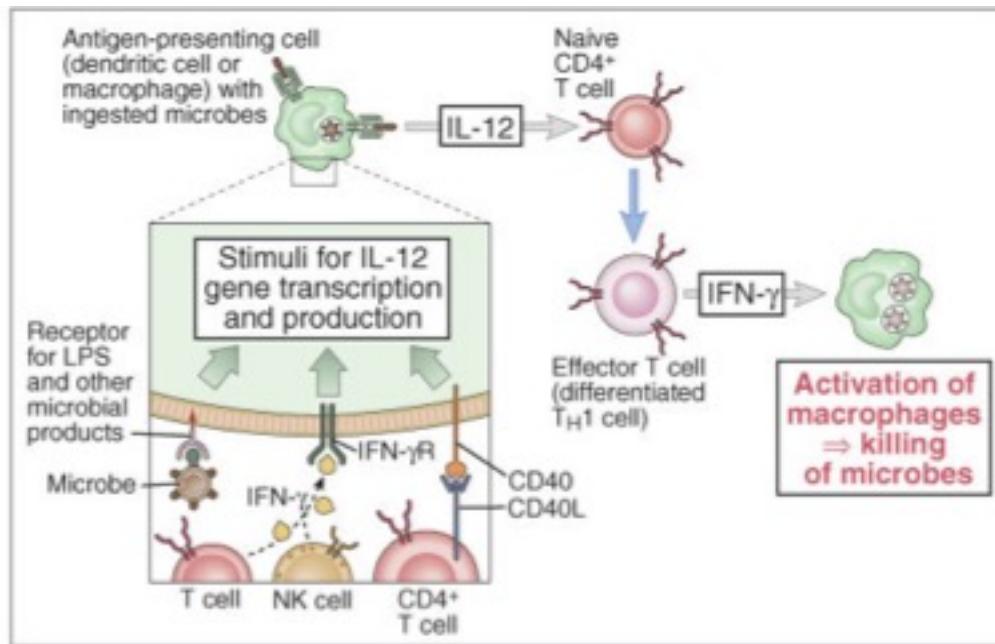


Le DC durante l'infezione da *M. tuberculosis* producono IL-12 che è la citochina fondamentale nello sviluppo dei linfociti Th1 che avviene nei linfonodi.



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- $\gamma$ .

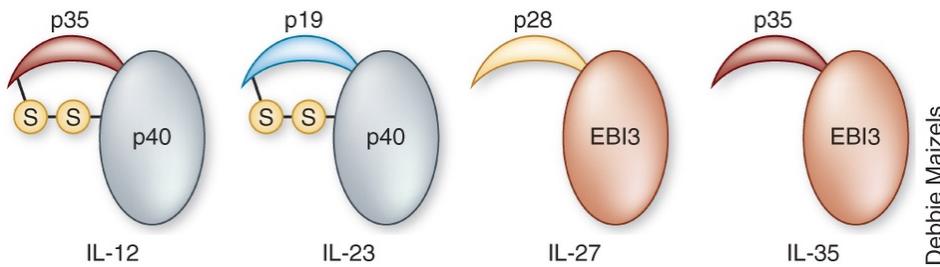
# Le cellule dendritiche producono IL-12 durante l'infezione da *M.tuberculosis*



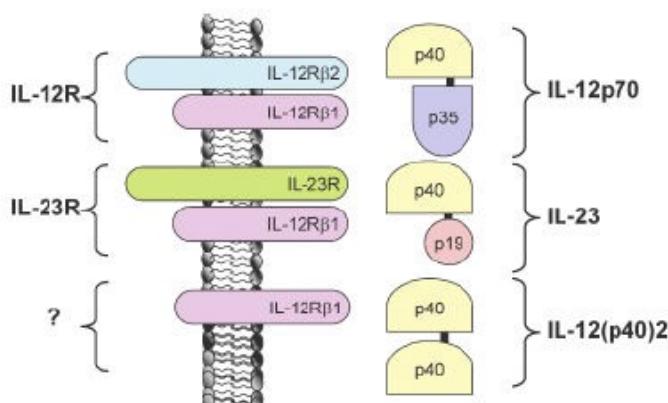
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)

Durante l'infezione da *M. tuberculosis* le DC producono elevati livelli di IL-12. La stimolazione del TLR 2 e 9 espressi dalle cellule dendritiche è il segnale che induce i più alti livelli di produzione di IL-12 da parte delle DC.

# Ruolo delle citochine appartenenti alla famiglia dell'IL-12 nell'induzione e nel mantenimento della risposta T contro *M. tuberculosis*



Le citochine appartenenti alla famiglia dell'IL-12 sono composte da due subunità la cui espressione è regolata indipendentemente. L'IL-12 è costituita dall'eterodimero 35p e 40p, l'IL-23 da p19 e p40, l'IL-27 da p28 e Epstein Barr virus induced gene 3 e p28, l'IL-35 da p35 e EBI3. Esistono inoltre monomeri o dimeri di p40 IL-12p40. Molti tipi cellulari sono in grado di produrre la subunità p35, solo le cellule dendritiche e i macrofagi producono la subunità p40.



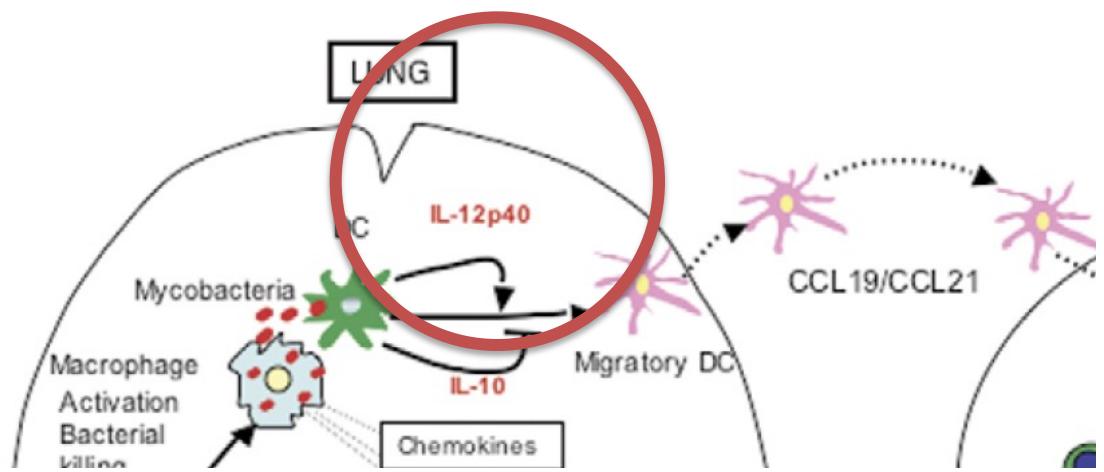
# Effetto dell'assenza dei diversi dimeri di IL-12p40 sul contenimento dell'infezione da *M. tuberculosis*

tabella 1

Bacterial load in IL-12 knock out mice.

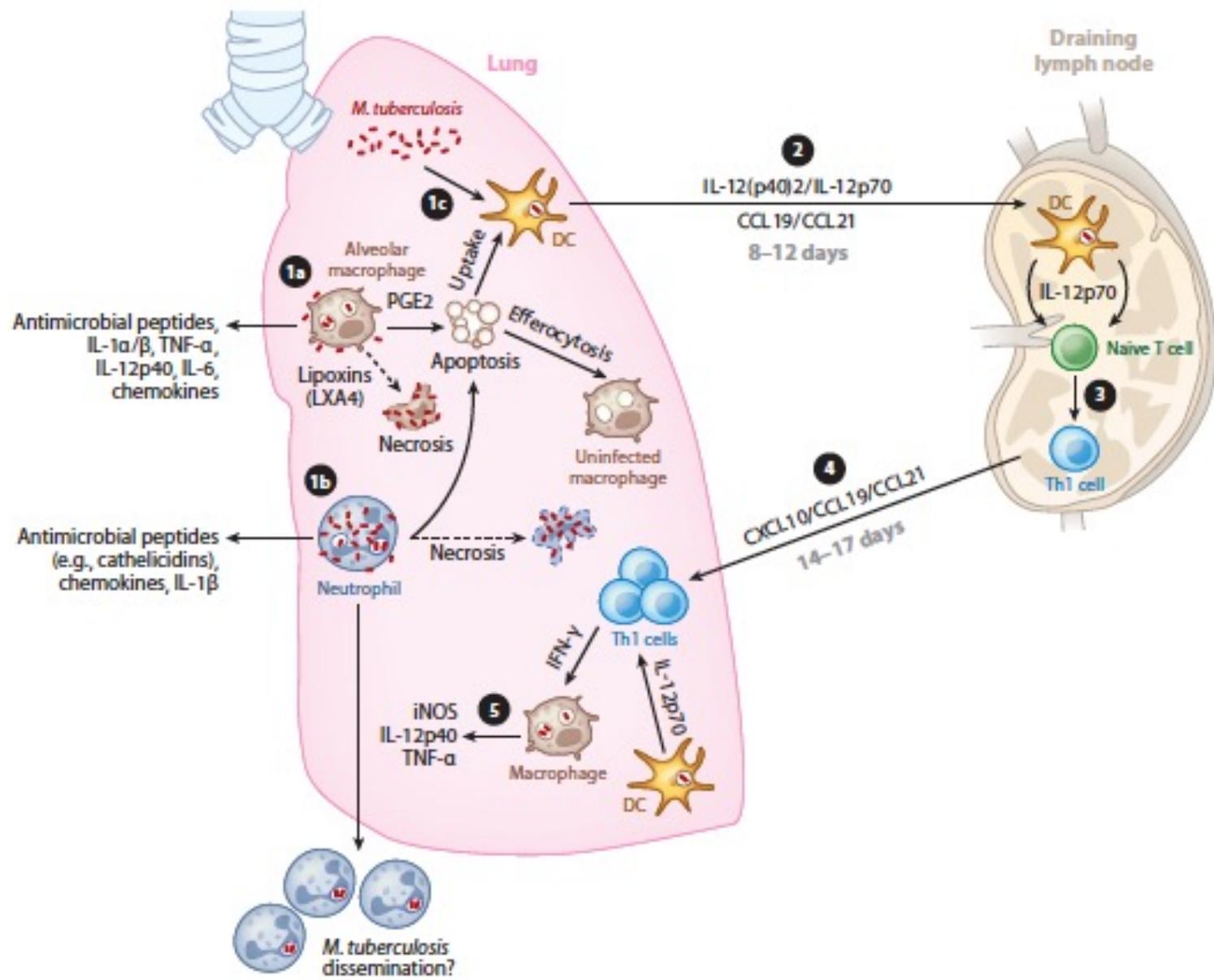
Strain	Present	Absent	Bacterial load (compared to WT)
IL-12p40 <sup>-/-</sup>	—	IL-12(p40) <sub>2</sub> IL-12p70 IL-23	↑↑ Lungs, spleen, liver, DLN – 4 weeks post aerosol Mtb <sup>47</sup> Lungs, spleen, liver – 3 and 5 weeks post i.v. Mtb <sup>45</sup> Lungs, spleen – 4 weeks post aerosol Mtb <sup>35</sup>
IL-12p35 <sup>-/-</sup>	IL-12(p40) <sub>2</sub> IL-23	IL-12p70	↑ Lungs, spleen, liver, DLN – 4 weeks post aerosol Mtb <sup>47</sup> Lungs, spleen, liver – 8 and 17 weeks post i.v. BCG <sup>46</sup>
IL-12p19 <sup>-/-</sup>	IL-12(p40) <sub>2</sub> IL-12p70	IL-23	• Lungs, spleen, liver, DLN – 4 weeks post aerosol Mtb <sup>47</sup>

# Ruolo delle IL-12p40 nell'induzione della risposta T verso *M. tuberculosis*



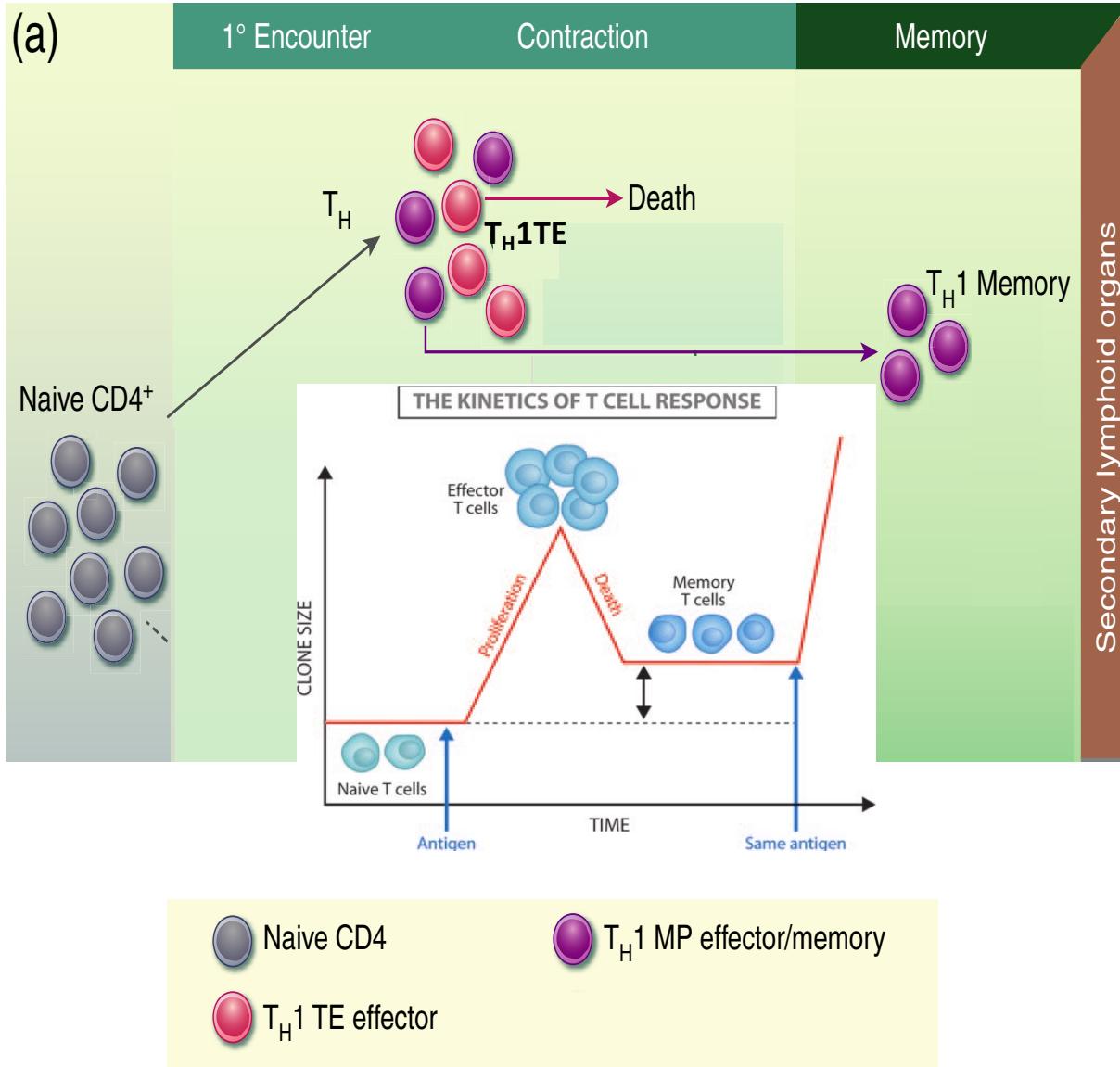
I topi KO per la catena p40 dell' IL-12 sono più suscettibili alla infezione da *M.tuberculosis* rispetto ai topi p35 KO.

Nei topi che mancano dell' IL-12p40 non si accumulano linfociti T attivati nel polmone. La migrazione delle DC, mediata dalle chemochine associate al reclutamento nei linfonodi, richiede la presenza di IL-12p40. L' esposizione delle DC al Micobatterio determina la secrezione di IL-12p40 che agisce in modo autocrino rendendo le DC responsive alle chemochine CCL19/CCL21. L' omodimero IL-12p40 è secreto dalle DC in risposta alla stimolazione del TLR9 e del TLR2. Il DNA genomico di *M. tuberculosis* è un potente agonista del TLR9.



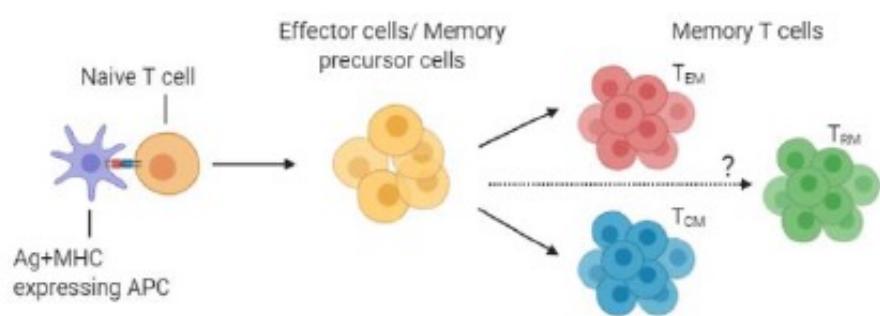
# Linfociti T effettori e della memoria

(a)



L'interazione con le cellule dendritiche presentanti l'antigene induce una elevata proliferazione dei linfociti T CD4 e il loro differenziamento in linfociti T effettori TE e linfociti T della memoria. I linfociti TE dopo aver eliminato il patogeno vanno incontro a morte mentre persistono i linfociti T della memoria. I linfociti T della memoria sono cellule non proliferanti che possono essere suddivise in sottopopolazioni in base all'espressione di marcatori di membrana, localizzazione tissutale e caratteristiche funzionali.

## Popolazioni di cellule della memoria

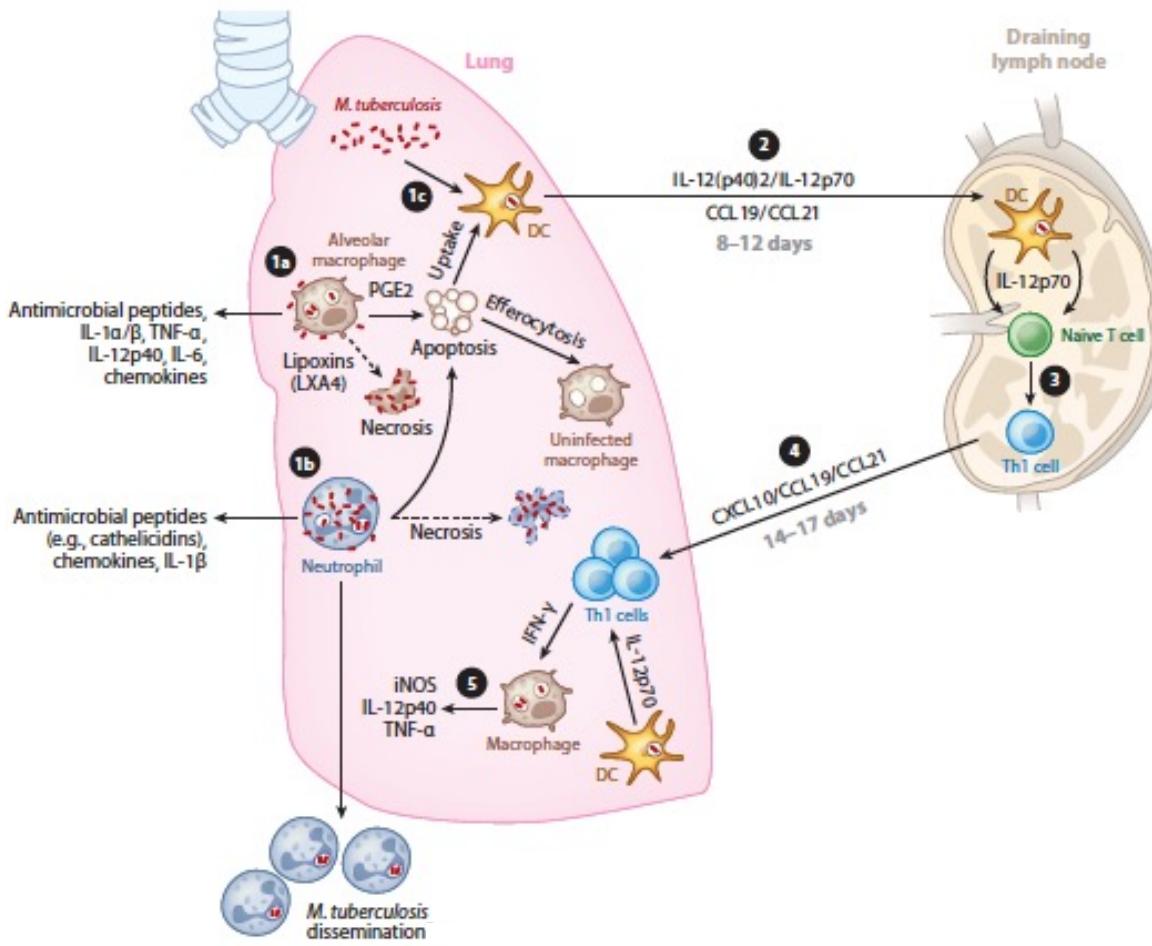


Le cellule della memoria sono distinte in cellule della memoria centrale ( $T_{CM}$ ), cellule della memoria effettive ( $T_{EM}$ ) e cellule della memoria residenti ( $T_{RM}$ ). Le cellule della memoria centrale ricircolano fra il sangue e i linfonodi, hanno una elevata capacità di proliferare ma ridotta capacità di produrre citochine.

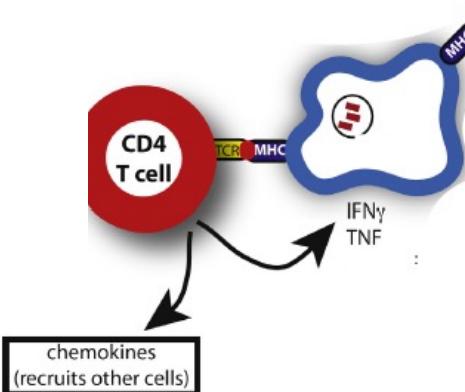
Diversamente i linfociti  $T_{EM}$  circolano nel sangue e nel corso delle infezioni si localizzano preferenzialmente nei tessuti periferici, hanno capacità di produrre le citochine caratteristiche di ciascuna sottopopolazione (IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-17) e ridotta capacità proliferativa.

I  $T_{RM}$  sono linfociti che risiedono nei tessuti.

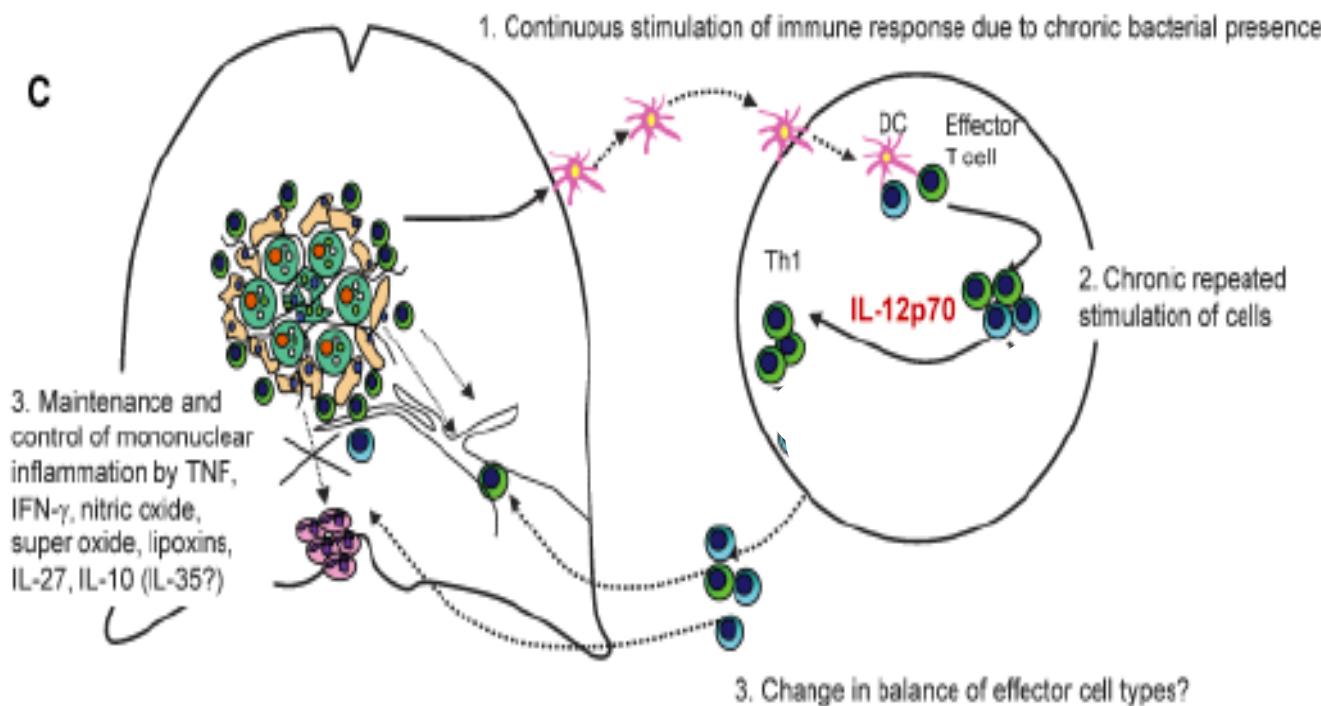
# Migrazione dei linfociti Th1 nel polmone



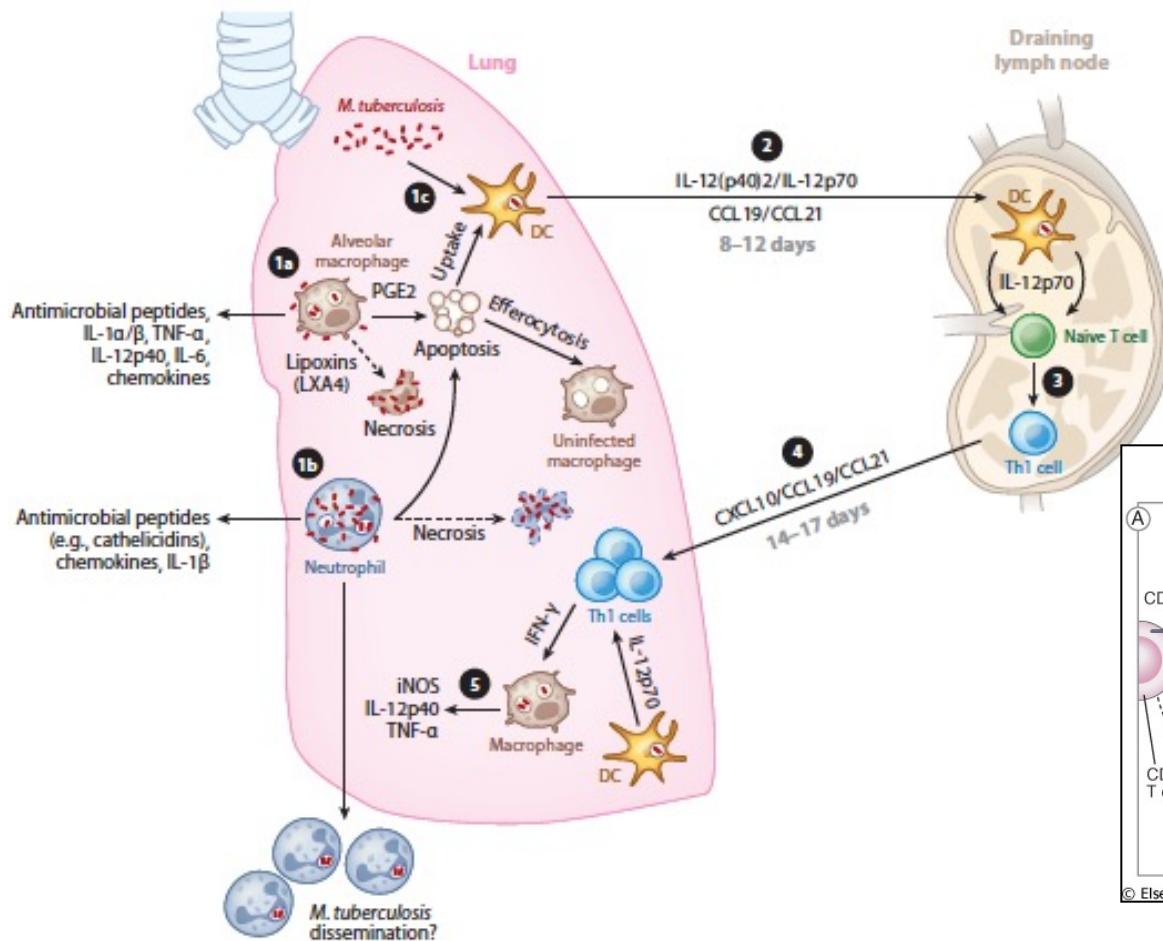
I linfociti Th1 effettori specifici per il *M. tuberculosis* lasciano gli organi linfoidi e tornano nel polmone richiamati da chemochine specifiche. In seguito al contatto con i macrofagi i linfociti T produrranno IFN- $\gamma$  e attiveranno i macrofagi.



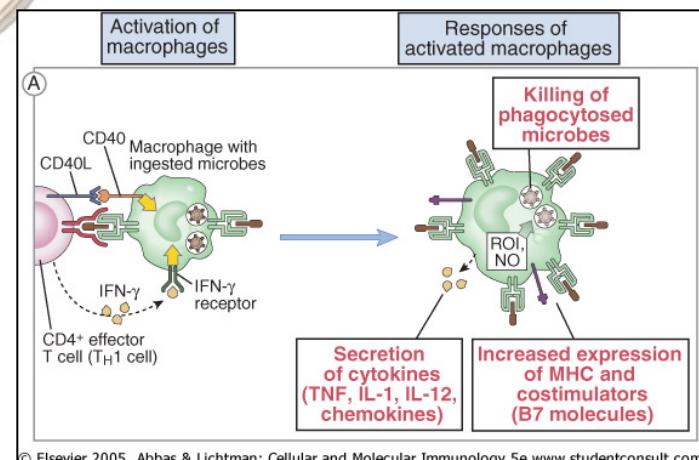
# La persistenza del batterio è una caratteristica dell' infezione tubercolare.



# L'attivazione e il richiamo nel polmone dei linfociti T CD4+ produttori IFN- $\gamma$ sono necessari per il controllo dell'infezione da *M. tuberculosis*



L'IFN- $\gamma$ , prodotto dai linfociti Th1 micobatterio specifici, attiva i macrofagi potenziandone l'attività antimicrobica.



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

# Funzioni effettive dei linfociti Th1 specifici per *M. tuberculosis*

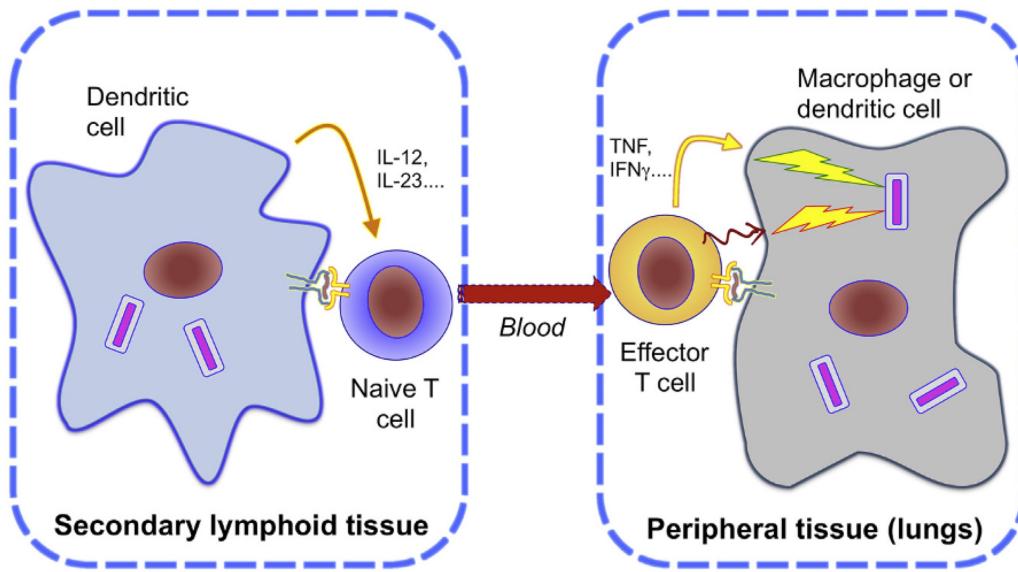
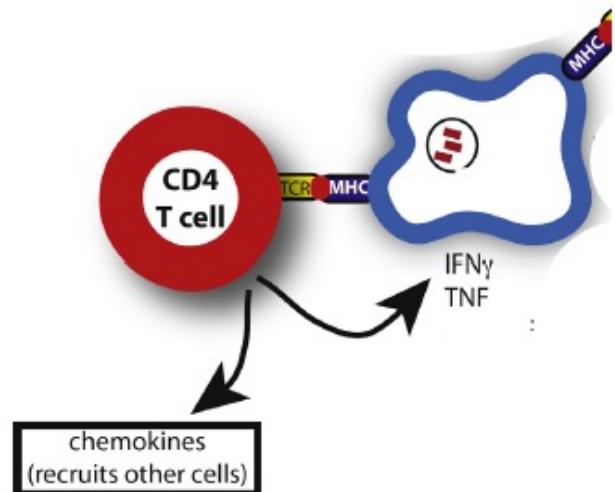


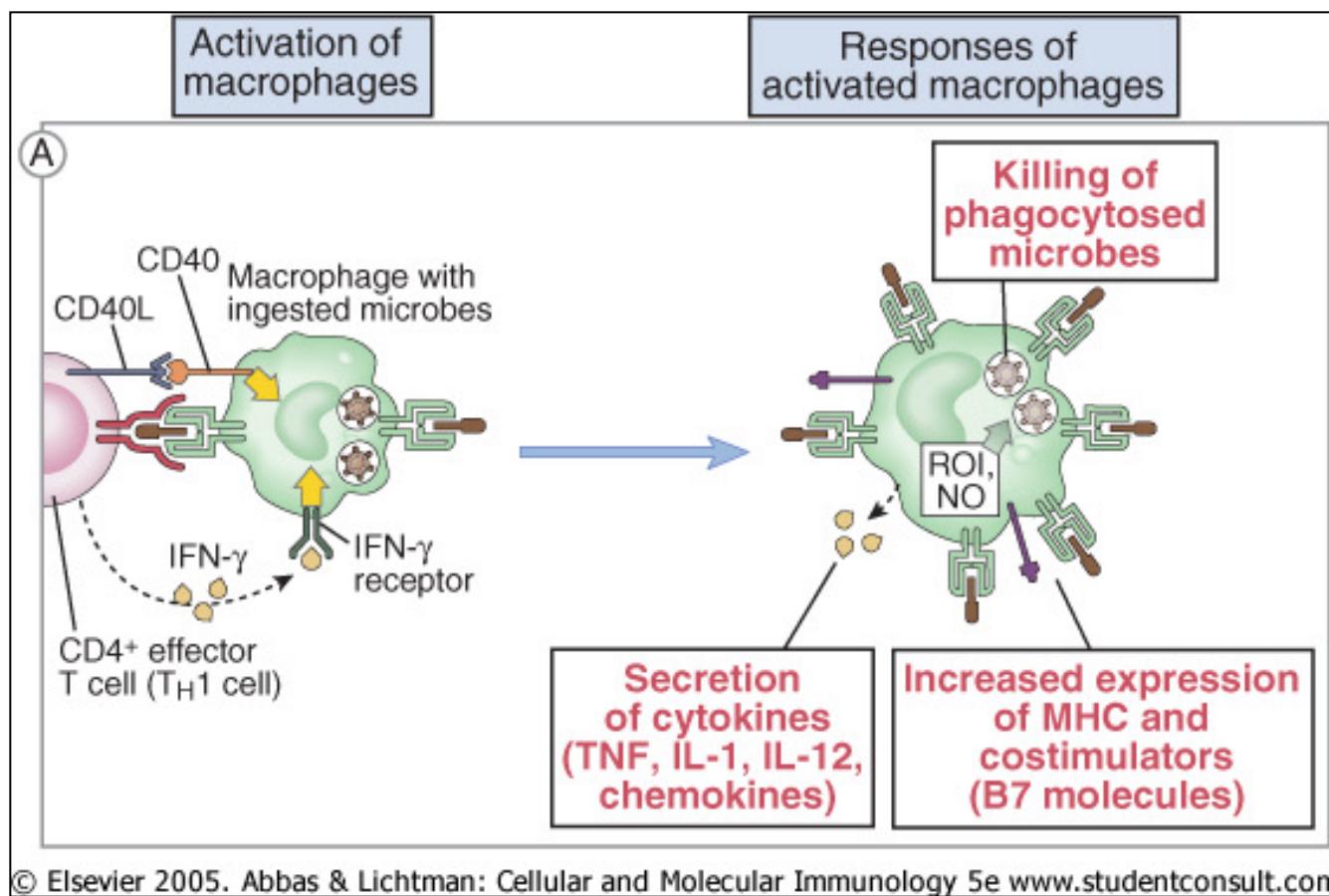
Figure 1. T Cells Must Be Activated in Distinct Compartments for Protection

Naive T cells are primed by their cognate antigens in secondary lymphoid tissues. Priming initiates the clonal expansion of T cells and is influenced by cytokines produced by dendritic cells, leading to their differentiation into effector or memory T cell subsets, and egress from the lymph node via the blood. To accomplish effector functions, T cells must traffic to the site of infection and be activated by recognizing their cognate epitope presented by infected cells, to secrete cytokines (curved solid arrow in figure) and express surface ligands for activating receptors (squiggly arrow in figure) that activate intracellular microbicidal mechanisms. If T cells cannot be activated at the site of infection, they will not contribute to control of the infection.



In seguito al riconoscimento dell'antigene presentato dai macrofagi i linfociti T mediano diverse funzioni effettive. In particolare i Th1 producono oltre all'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e chemochine.

# Effetti dell'IFN- $\gamma$ sui macrofagi



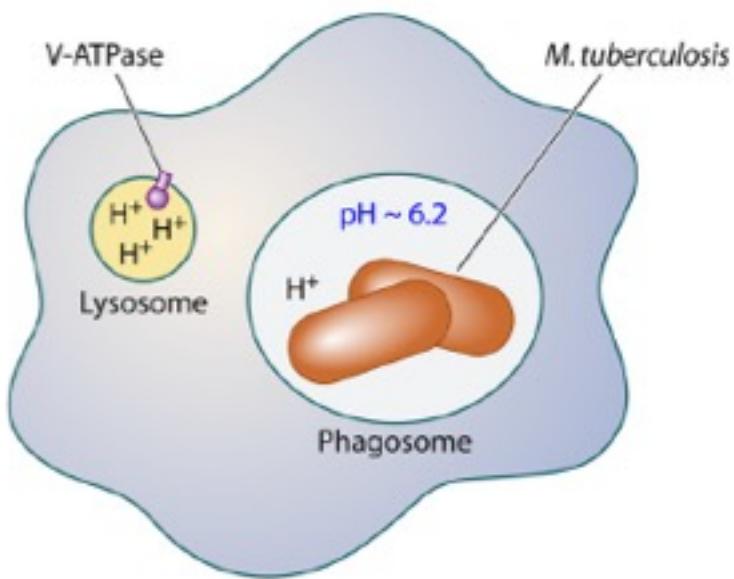
L'IFN- $\gamma$  sui macrofagi induce:

**maggior espressione delle molecole MHC**= maggior riconoscimento da parte delle cellule T

**maggior attività antimicrobica:** aumento della sintesi di iNOS e attivazione NADPH ossidasi aumento della maturazione del fagosoma.

maggior produzione di citochine.

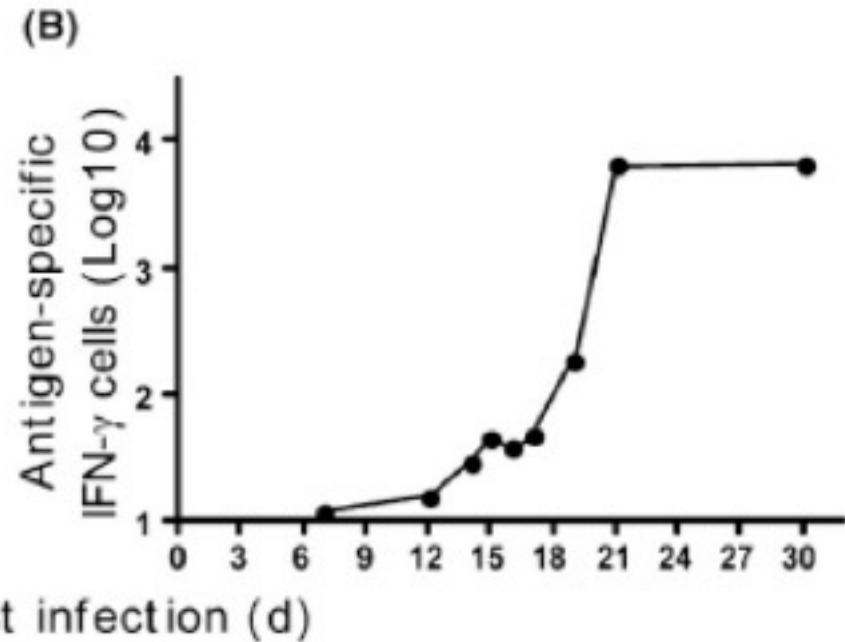
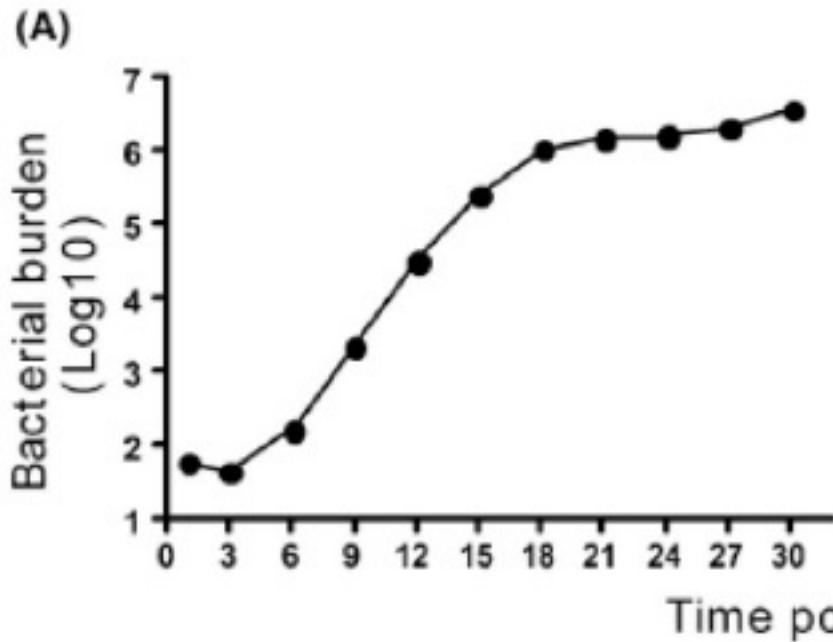
# Meccanismi microbicidi rilevanti nella eliminazione di *M.tuberculosis* nei macrofagi murini attivati



Il trattamento dei macrofagi murini con IFN- $\gamma$  prima dell'infezione con *M. tuberculosis* aumenta in modo significativo l'uccisione dei batteri intracellulari attraverso l'induzione **della ossido nitrico sintasi** (catalizza la conversione dell'arginina in citrullina con liberazione di ossido nitrico diffusibile) con produzione delle specie reattive dell'azoto. L'IFN- $\gamma$  aumenta la **maturazione del fagosoma**.

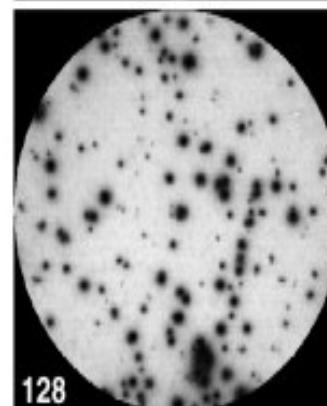
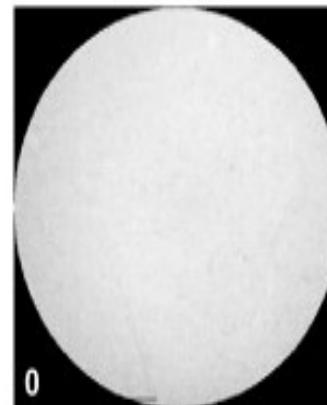
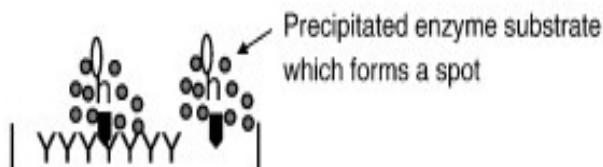
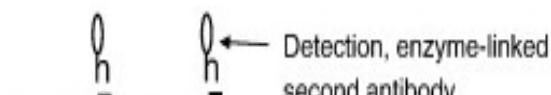
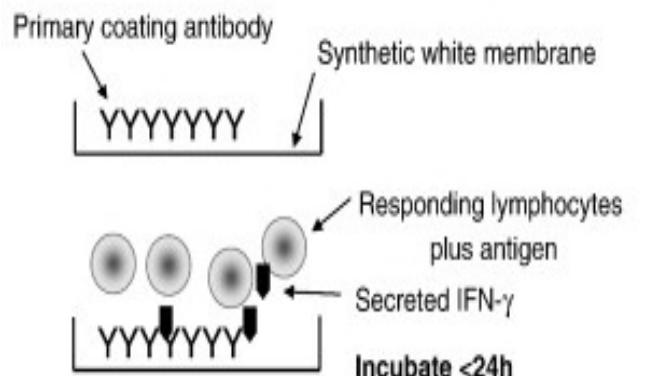
L'IFN- $\gamma$  attiva l'**autofagia** e rimuove il blocco di *M. tuberculosis* negli endosomi precoci dirigendoli verso l'autofagosoma.

**La presenza di linfociti T specifici per *M. tuberculosis* nel polmone si associa ad un arresto della replicazione batterica**

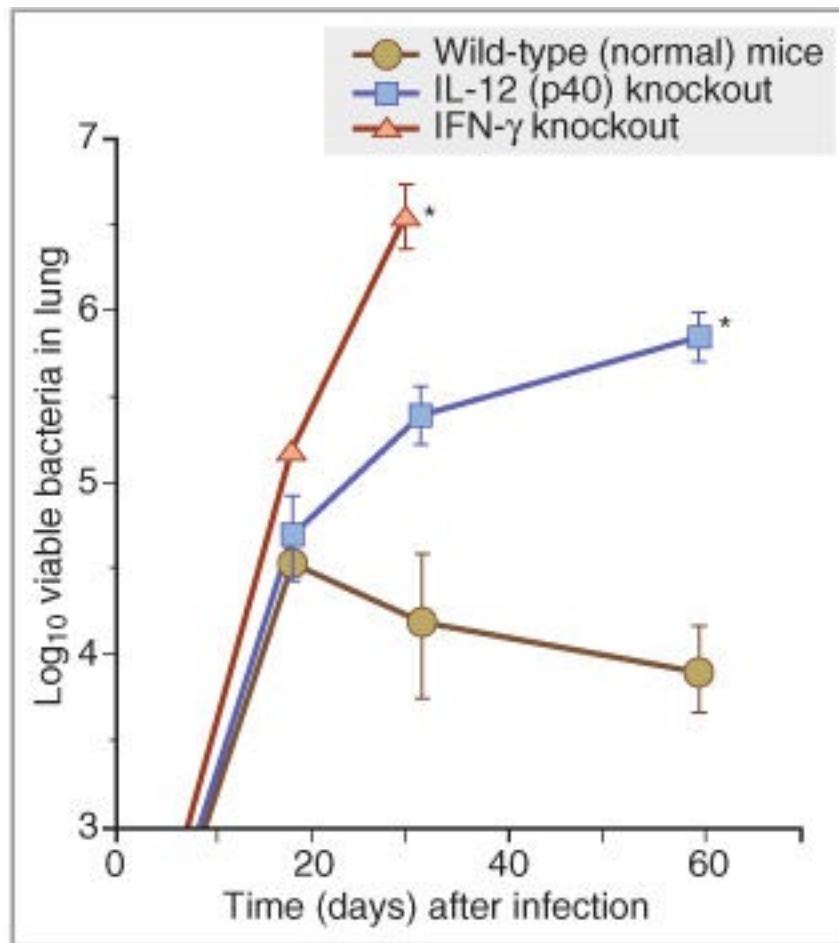


# Il saggio Elispot permette di quantificare i linfociti T specifici per l'antigene producenti IFN-γ

## ELISPOT Assay



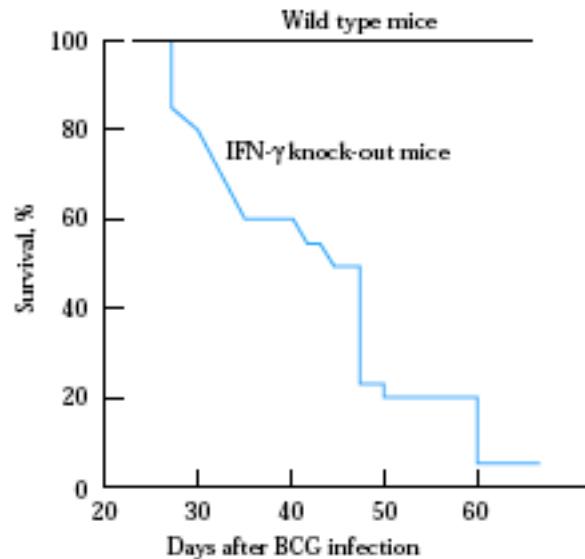
## L'IL-12 e l'IFN- $\gamma$ sono necessari nel controllo dell'infezione da parte di *M. tuberculosis*



Il pathway IL-12/IFN- $\gamma$  svolge un ruolo fondamentale nell'infezione da *M. tuberculosis*.

Questo pathway lega l'immunità innata alla risposta adattativa contro *M. tuberculosis* dominata dai linfociti Th1.

# La risposta immune protettiva verso *M. tuberculosis* è mediata dai linfociti T CD4+ producenti IFN- $\gamma$

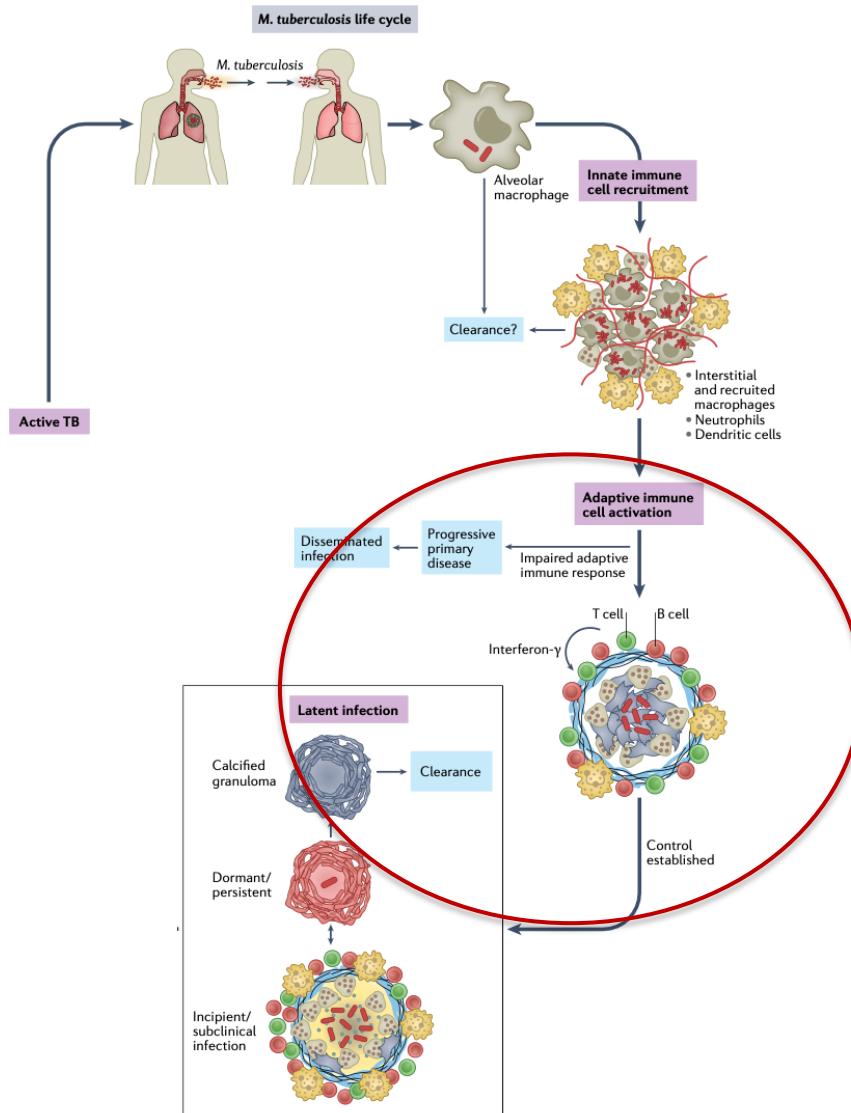


**FIGURE 16-19** Experimental demonstration of the role of IFN- $\gamma$  in host defense against intracellular pathogens. Knockout mice were produced by introducing a targeted mutation in the gene encoding IFN- $\gamma$ . The mice were then infected with  $10^7$  colony-forming units of attenuated *Mycobacterium bovis* (BCG) and their survival monitored. (Adapted from D. K. Dalton et al., 1993, Science 259:1739.)

I topi KO per l'IFN- $\gamma$  non sono in grado di controllare infezioni anche a basse dosi di *M.tuberculosis*.

In assenza di IFN- $\gamma$  si osserva una replicazione incontrollata del batterio e distruzione tissutale che determina la morte.

# Meccanismo del controllo dell'infezione da parte della immunità adattativa



Una risposta adattativa efficace è necessaria per prevenire la forma disseminata di infezione da *M. tuberculosis*.

In presenza di una risposta immune efficace si forma il granuloma tubercolare maturo che controlla e in alcuni casi elimina l'infezione.

I linfociti T CD4+ e il TNF- $\alpha$  sono necessari per la formazione del granuloma tubercolare.

Gli individui infettati da HIV con disfunzioni delle cellule T non sono in grado di formare un granuloma ben organizzato.

# Struttura del granuloma tubercolare

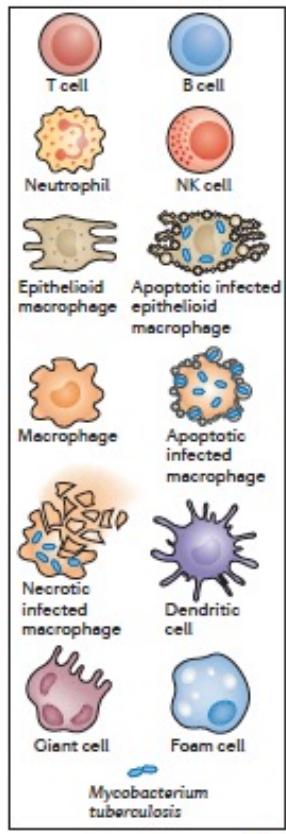
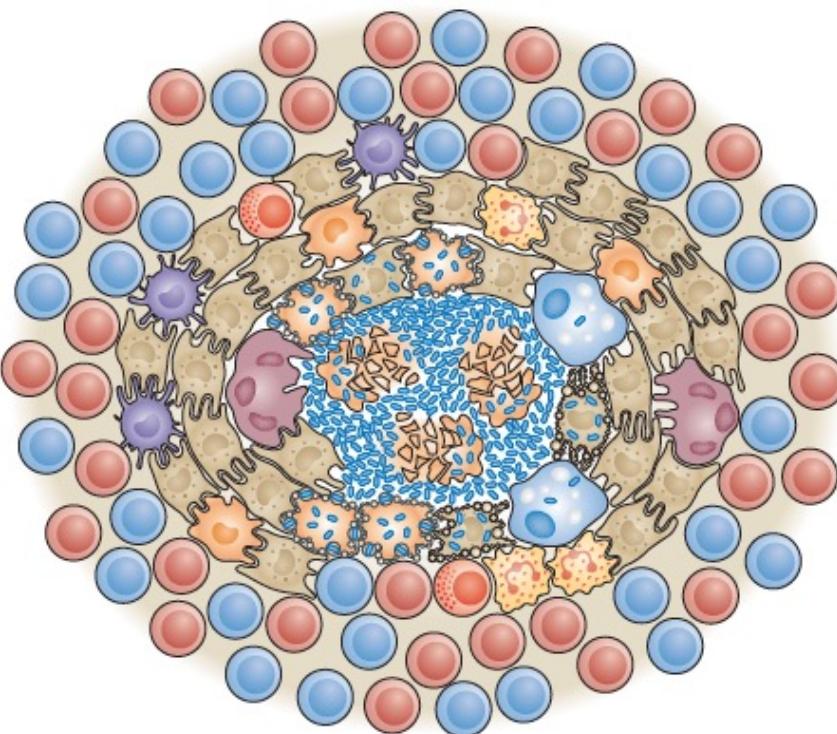


Figure 1 | Structure and cellular constituents of the tuberculous granuloma. The tuberculous granuloma at its most basic is a compact, organized aggregate of epithelioid cells—macrophages that have undergone a specialized transformation to have tightly interdigitated cell membranes that link adjacent cells. Epithelioid cells can be highly phagocytic but in some cases do not contain bacteria at all. Granuloma macrophages can also fuse into multinucleated giant cells or differentiate into foam cells, which are characterized by lipid accumulation. Foam cells have been noted to be most frequently located at the rim of the necrotic centre of a mature tuberculous granuloma. The consequences of these changes are not well understood, but in general foam cells and multinucleated giant cells have been reported to contain only a few bacteria, if any. Bacteria are most commonly present in the central necrotic areas in which dead and dying macrophages can be seen. Many other cell types also populate the granuloma, such as neutrophils, dendritic cells, B and T cells, natural killer (NK) cells, fibroblasts and cells that secrete extracellular matrix components. Finally, the epithelial cells surrounding the granuloma (not shown) are now thought to participate in its formation also.

Il granuloma tubercolare è un aggregato compatto di macrofagi maturi. All'interno sono presenti macrofagi infettati circondati da macrofagi non infetti.

Altre cellule quali i monociti e i linfociti T e B circondano i macrofagi. Il granuloma è delimitato da una capsula fibrotica costituita da collagene e altre proteine della matrice extracellulare. Questa risposta tissutale è tipica della fase di contenimento dell'infezione.

# Il granuloma tubercolare



I macrofagi maturi del granuloma possono andare incontro a modificazioni morfologiche. Si possono fondere per formare cellule giganti. Possono differenziare in cellule schiumose che sono caratterizzate da un accumulo di lipidi. Possono trasformarsi in cellule epitelioidi in cui le cellule sono strettamente associate fra loro attraverso delle interdigitazioni della membrana plasmatica.

## Funzione del granuloma

Diverse evidenze indicano che il granuloma tubercolare maturo rappresenta una struttura finalizzata al contenimento dell'infezione.

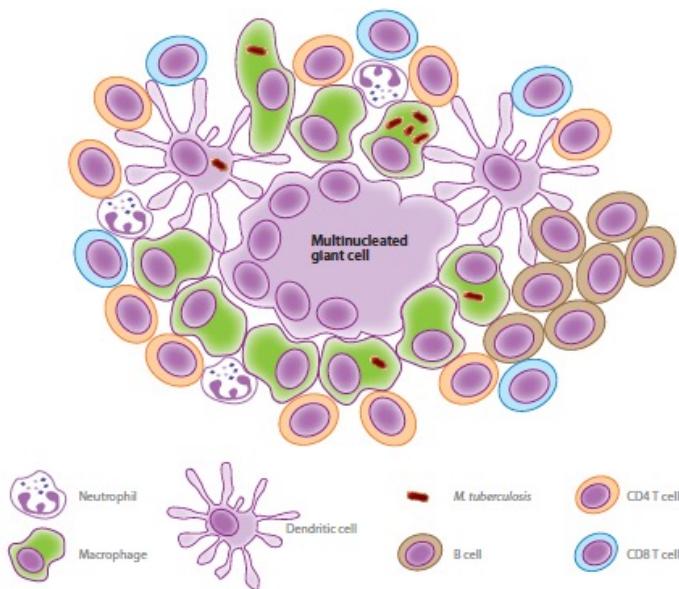
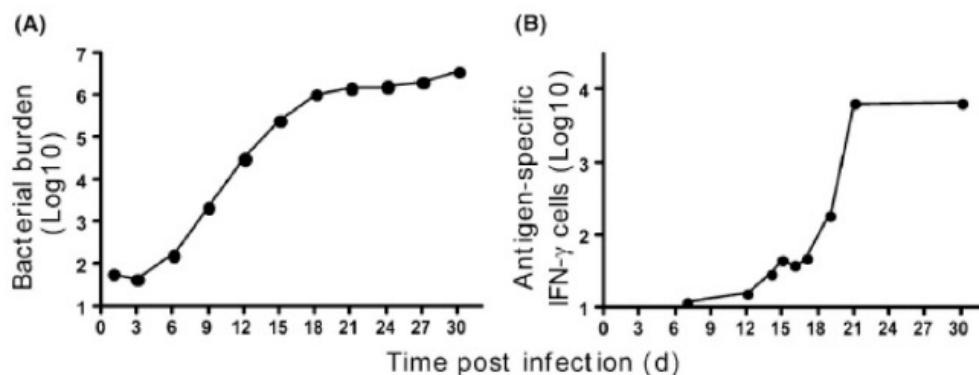
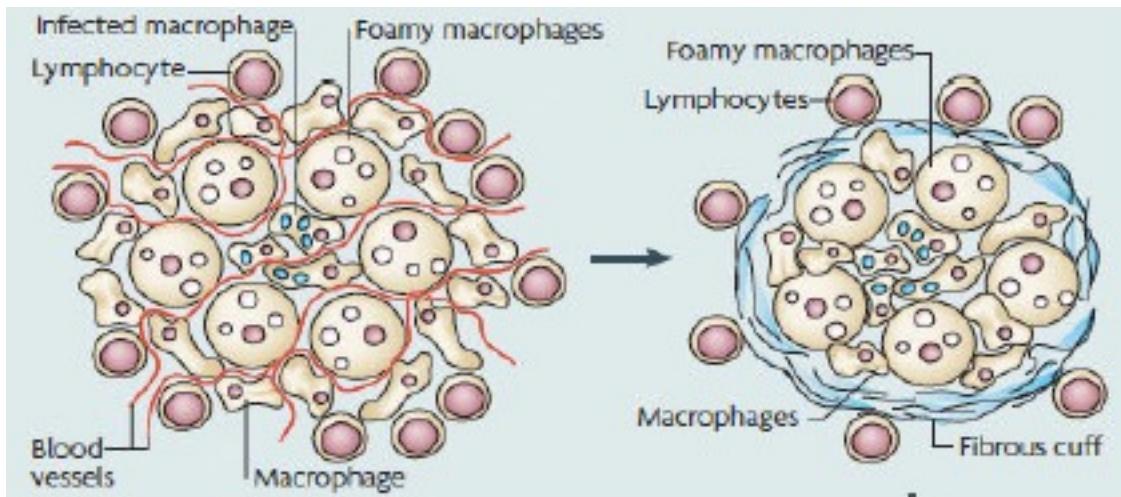


Figure 4

The cellular composition of a representative *Mycobacterium tuberculosis* granuloma. Individual granulomas can exhibit diverse morphologies, including striking areas of central caseous necrosis. The cells depicted have been identified in human granulomas, as well as in those of experimentally infected animals. A characteristic finding is that a small minority of the macrophages and dendritic cells in granulomas are infected by *M. tuberculosis*.

- Presenza di granulomi guariti e calcificati in individui sani
- Associazione fra ipersuscettibilità all'infezione da *M. tuberculosis*, in individui con immunodeficienze in IFN- $\gamma$ , IL-12 e scarsa presenza di granulomi.

# Maturazione del granuloma



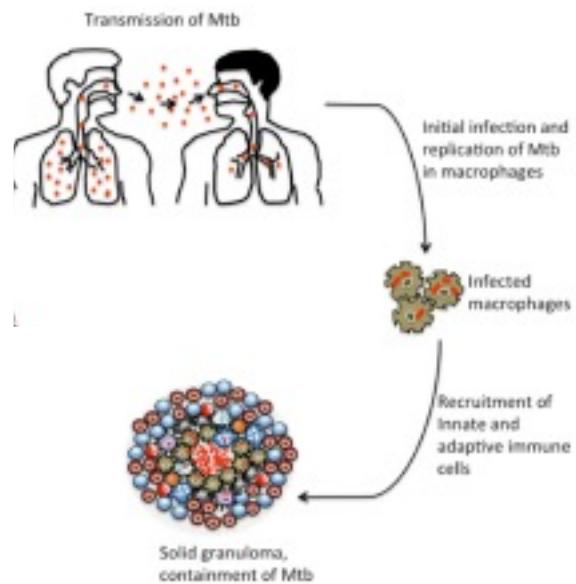
Nel modello classico la formazione del granuloma richiede l'immunità adattativa.

In seguito alla migrazione dei linfociti Th1 dal linfonodo al sito dell'infezione il granuloma si organizza strutturalmente con i macrofagi infettati all'interno circondati da linfociti T all'esterno.

Per questo la risposta adattativa è stata considerata essenziale alla formazione del granuloma.

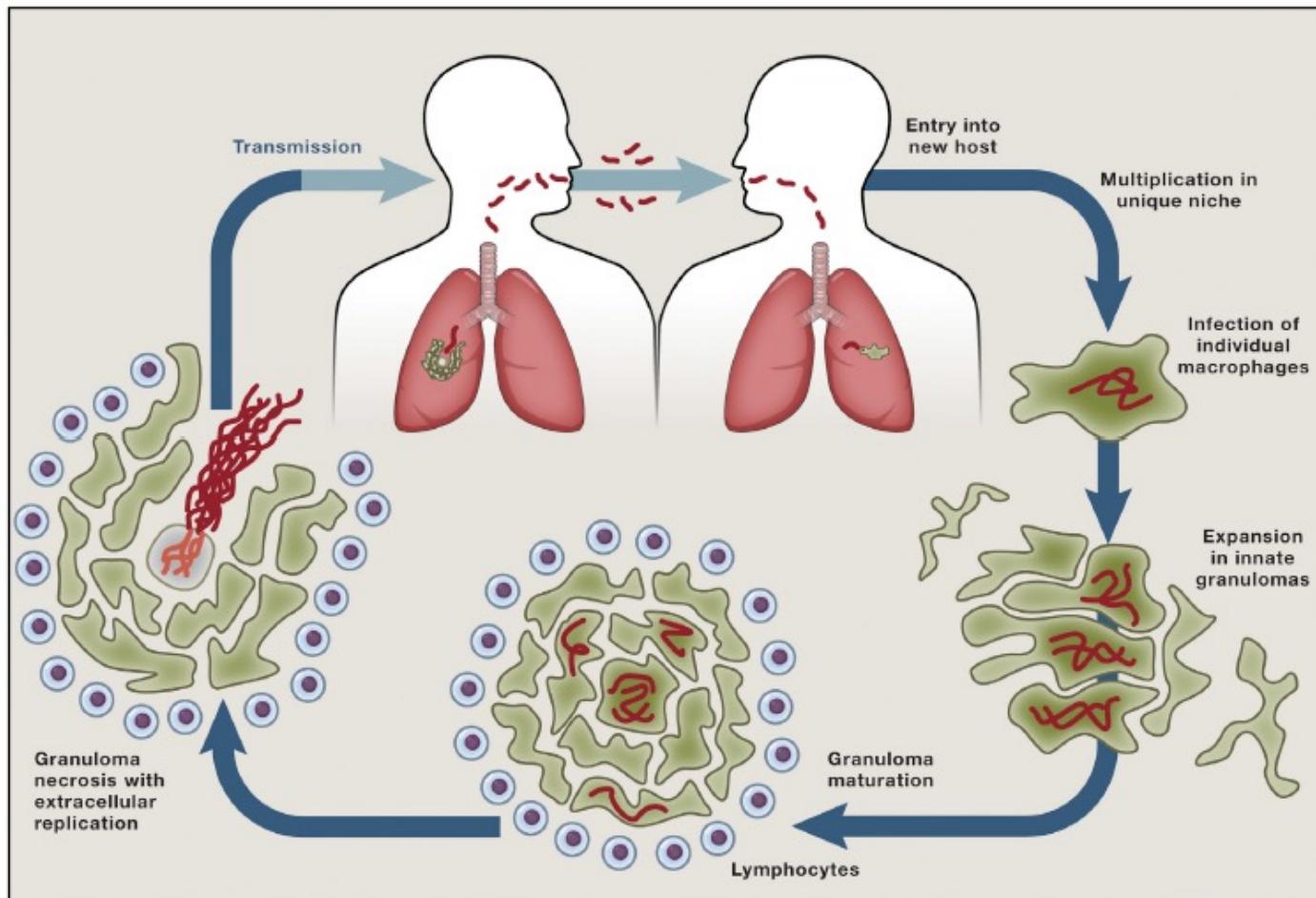
Il concetto che il granuloma limita l'infezione isolando il batterio ha dominato la letteratura medica e immunologica per molti anni.

# Funzioni del granuloma



La formazione del granuloma avviene sin dall'inizio dell'infezione da parte di *M. tuberculosis*. Tale struttura è costituita inizialmente da un aggregato di macrofagi infetti che il batterio sfrutta per poter proliferare nell'ospite. In seguito all'induzione della risposta adattativa il granuloma acquisisce l'azione di contenimento.

# Ciclo vitale patogenico di *M. tuberculosis*

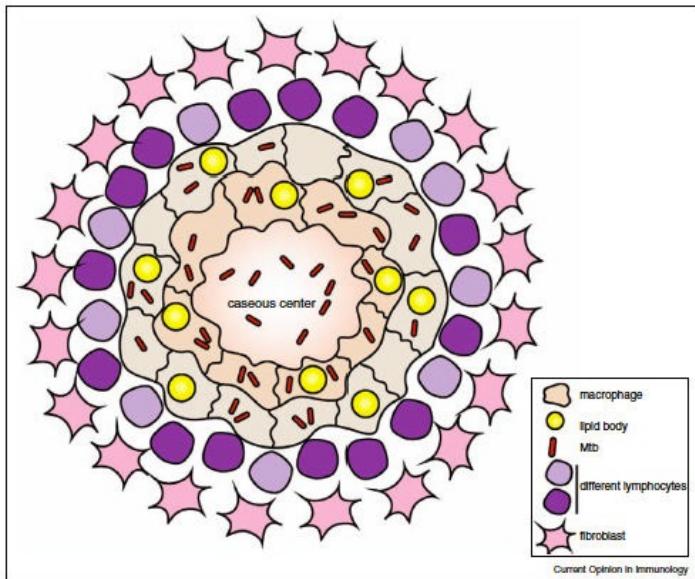


**Figure 1. Pathogenic Life Cycle of *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* infection initiates when fine aerosol particles containing the bacteria coughed up by an individual with active disease are deposited in the lower lungs of a new host. The bacteria recruit macrophages to the surface of the lung, which become infected, and serve to transport the bacteria across the lung epithelium to deeper tissues. A new round of macrophage recruitment to the original infected macrophage is initiated, forming the granuloma, an organized aggregate of differentiated macrophages and other immune cells. The granuloma in its early stages expands infection by allowing bacteria to spread to the newly arriving macrophages. As adaptive immunity develops, the granuloma can restrict bacterial growth. However, under many circumstances, the infected granuloma macrophages can undergo necrosis, forming a necrotic core that supports bacterial growth and transmission to the next host.

# Beneficio biologico del granuloma

Figure 3



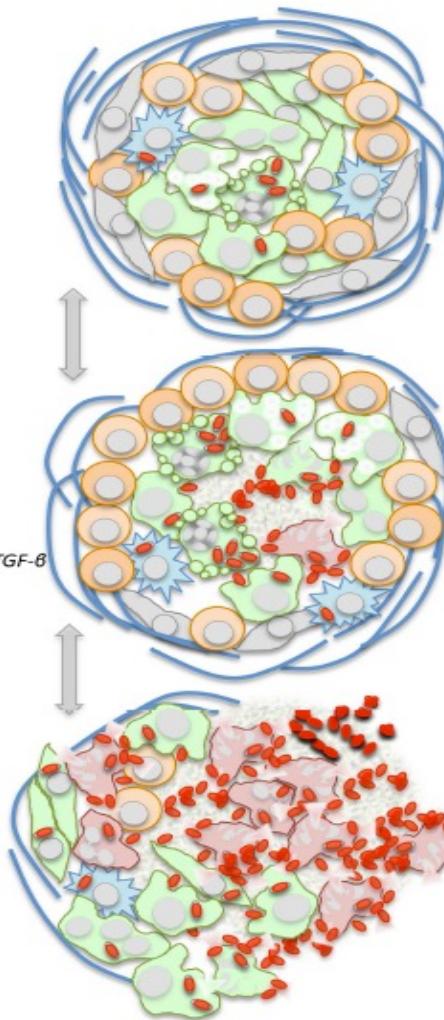
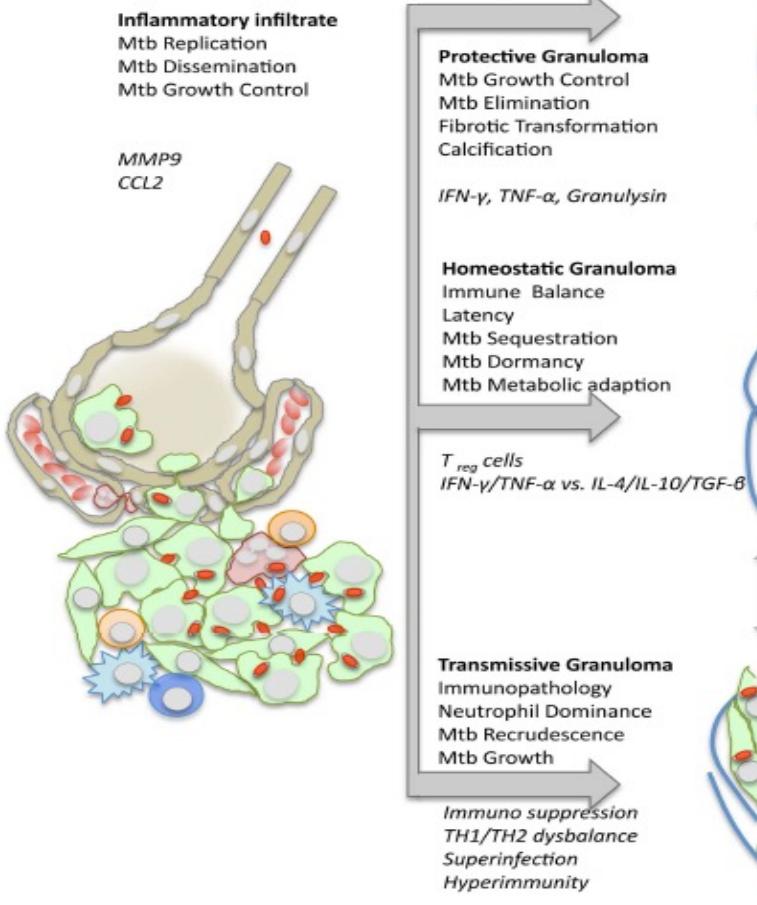
Complex granulomas contain mycobacteria long term. Mature mycobacterial granulomas in many hosts contain rings of macrophages around a necrotic caseous center. Foam cells, which contain large lipid bodies (shown in yellow), as well as multinucleated giant cells and epithelioid-like macrophages are some of the specialized macrophages in these regions. Multiple kinds of lymphocytes are present in an outer boundary, and fibroblasts are also present in mature granulomas.

Il granuloma beneficia sia il batterio garantendo l'infezione persistente sia l'ospite perché permette il contatto fra cellule presentanti l'antigene infettate (macrofagi e DC) e cellule immuni che possono controllare l'infezione.

Il primo stadio nella formazione del granuloma non è di per sé protettivo anzi si pensa possa favorire la diffusione del batterio.

Il granuloma tardivo diventa protettivo per l'ospite.

# Possibili evoluzioni del granuloma tubercolare

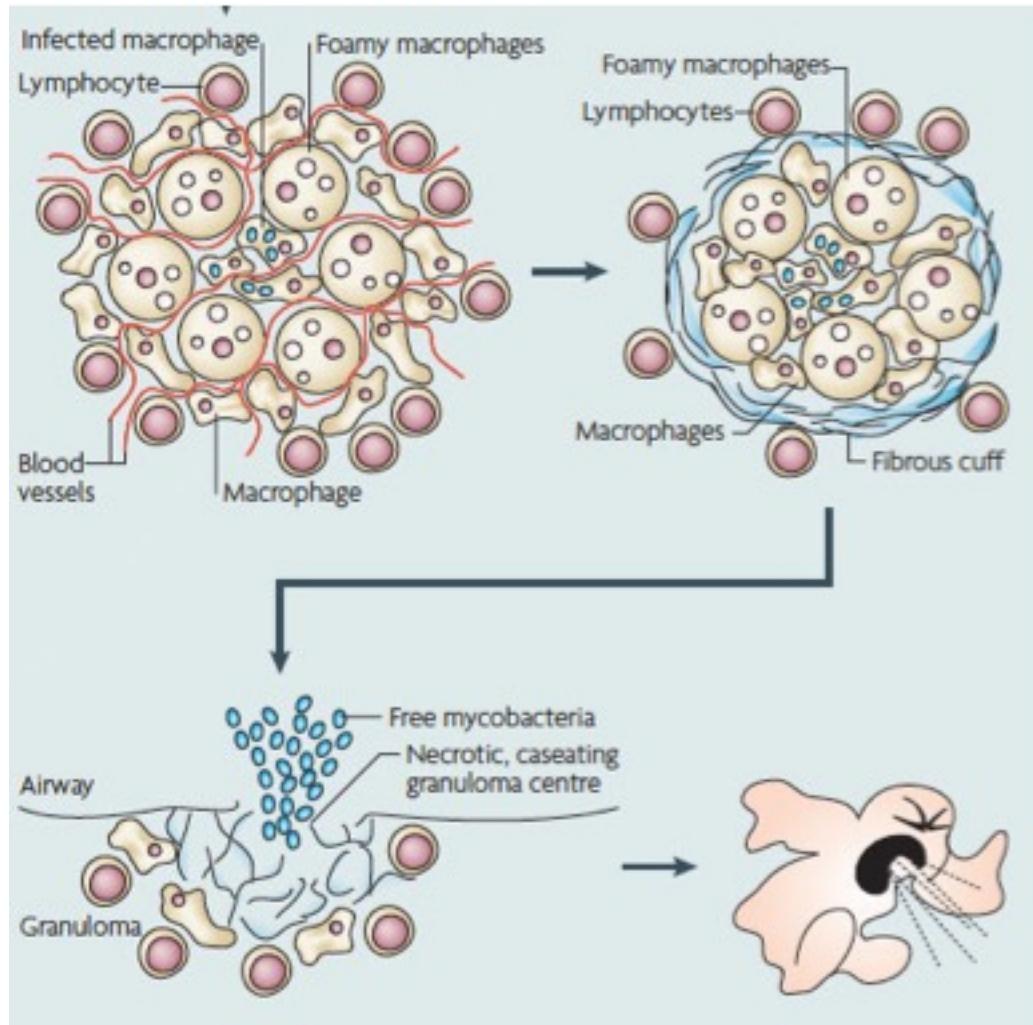


Dati epidemiologici indicano che in seguito allo sviluppo della risposta T questa possa in alcuni casi determinare l'eliminazione del micobatterio nel granuloma.

In altri casi il batterio può persistere in uno stato dormiente.

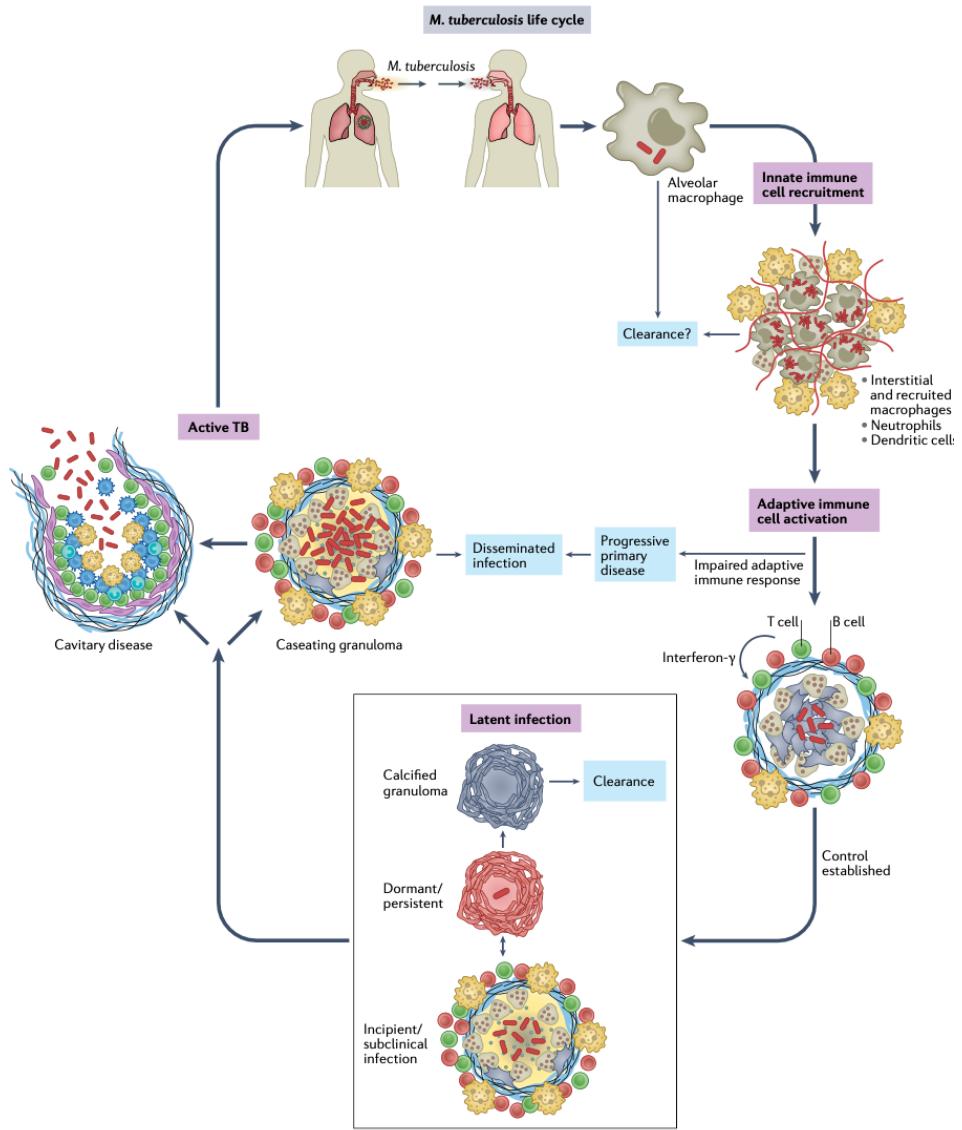
L'infezione nella tubercolosi latente può riattivarsi e progredire in TB attiva. Dati epidemiologici indicano che la trasmissione del micobatterio della tubercolosi avviene più frequentemente negli individui con granulomi organizzati che presentano una necrosi all'interno.

# La rottura del granuloma in seguito a qualsiasi condizione che riduce le cellule T CD4+ facilita la diffusione aerosol del batterio



L'azione di contenimento svolta dal granuloma tubercolare fallisce in quelle condizioni che riducono o alterano le funzioni delle cellule T CD4+ (malnutrizione, invecchiamento, infezione da HIV). In seguito a tali cambiamenti dello stato del sistema immune il granuloma va incontro a caseazione si rompe e libera migliaia di batteri vivi nelle vie aeree dell'individuo infetto.

# Ciclo vitale *M. tuberculosis*



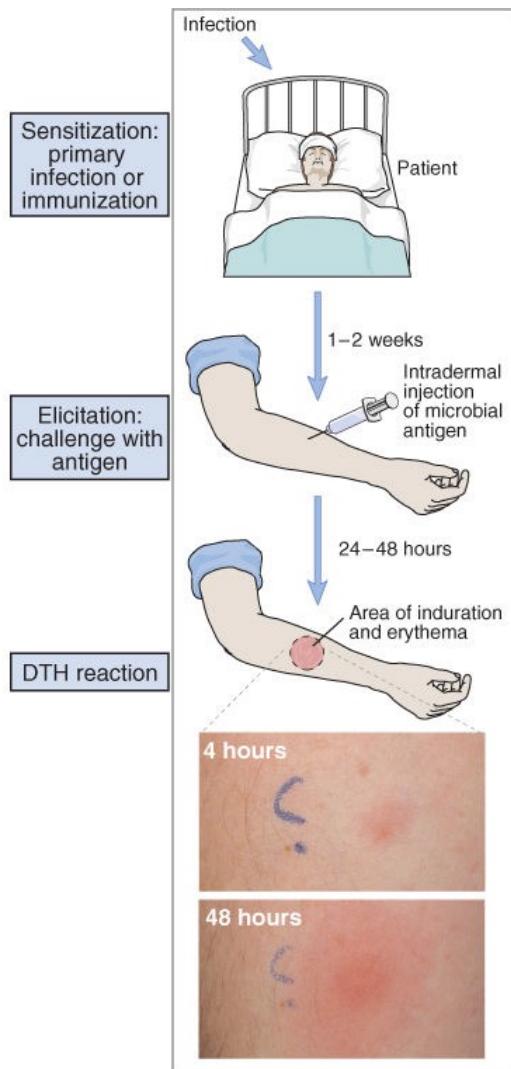
*M. tuberculosis* viene trasmesso via aerosol da un individuo con la forma attiva della tubercolosi. Le prime cellule ad essere infettate sono i macrofagi alveolari che dopo essere stati infettati migrano nell'interstizio polmonare. I macrofagi infettati richiamano altri macrofagi, i neutrofili e le cellule dendritiche sostenendo la replicazione del batterio.

Non è chiaro se in alcuni individui la risposta immune innata elimina il batterio. Le cellule dendritiche migrano nei linfonodi dove sono attivati i linfociti T specifici per il micobatterio.

I linfociti T migrano nel punto dell'infezione e sono necessari per il contenimento dell'infezione e per prevenire l'infezione disseminata. Si sviluppa il granuloma maturo.

In presenza di un sistema immune efficiente la maggior parte degli individui sviluppa una infezione latente. Il 5-10% degli individui infetti può sviluppare infezione attiva.

# Sequenza di eventi delle reazioni DTH



La reazione DTH indotta dall' inoculo intradermico del PPD in un individuo sensibilizzato si sviluppa in 24-48 ore.

Viene utilizzata per verificare se un individuo ha sviluppato una risposta immune contro il Micobatterio della tubercolosi (Skin test; tuberculin test).

Nelle prime 4 ore si accumulano nelle venule post capillari del sito di inoculo i neutrofili.

Dopo 12 ore compare un infiltrato linfo-monocitario in sede perivasale. Le cellule endoteliali che rivestono i capillari si rigonfiano e diventano più permeabili alle macromolecole presenti nel plasma. In seguito alla fuoriuscita del fibrinogeno si avrà la sua conversione in fibrina. L'infiltrato e la deposizione di fibrina determinano il rigonfiamento e l'indurimento del tessuto. Il TNF e l'IFN- $\gamma$  provocano alterazioni morfologiche nelle cellule endoteliali favorendo la fuoriuscita dal letto capillare di macromolecole quali il fibrinogeno.

## Nuovi saggi per la diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis*

Table 1: Differences In Currently Available IGAs

	QFT-GIT	T-Spot
Initial Process	Process whole blood within 16 hours	Process peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) within 8 hours, or if T-Cell Xtend® is used, within 30 hours.
<i>M. tuberculosis</i> Antigen	Single mixture of synthetic peptides representing ESAT-6, CFP-10 and TB7.7	Separate mixtures of synthetic peptides representing ESAT-6 and CFP-10
Measurement	IFN- $\gamma$ concentration	Number of IFN- $\gamma$ producing cells (spots)
Possible Results	Positive, negative, indeterminate	Positive, negative, indeterminate, borderline

Più recentemente sono stati sviluppati saggi (IGRA test=test di rilascio dell'IFN-gamma) che utilizzano antigeni specifici di *M. tuberculosis* (ESAT-6).

La reattività a questi antigeni è valutata in termini di produzione dell'IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T dell'individuo.

Il TST (tuberculin skin test) è stato inizialmente effettuato utilizzando un estratto di *M. tuberculosis*, successivamente l'estratto è stato sostituito con il protein purified derivative (PPD) di *M. tuberculosis*. Tuttavia poichè il PPD contiene più di 200 antigeni che sono in comune con molti micobatteri ambientali e non tubercolari questo saggio ha una bassa specificità.