

MEDIATORI DELL'INFIAMMAZIONE

I mediatori dell'inflammatione sono divisi in:

Mediatori di derivazione cellulare → sintetizzati dalle cellule che partecipano all'inflammatione.

- Istamina: è un mediatore preformato che si trova nei granuli di mastociti e basofili. Ha lo scopo di determinare vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare.
- Serotonina: viene rilasciata dalle piastrine attivate. Ha lo scopo di determinare vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare.
- Metaboliti dell'acido arachidonico: si genera a partire dai fosfolipidi di membrana per opera della fosfolipasi A2. L'acido arachidonico liberato può essere metabolizzato da:
 - Ciclossigenasi (COX): si formano i precursori PGG₂ e PGH₂, da cui originano prostaciclina, trombossano A2 e prostaglandine (PGD₂ e PGE₂).
I mastociti sintetizzano PGD₂, che causa vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare (stessa azione dell'istamina, ma agisce dopo).
I macrofagi sintetizzano PGE₂, che scatena il processo febbrile.
Le cellule endoteliali, in condizioni fisiologiche, producono la prostaciclina I₂, che inibisce l'aggregazione piastrinica.
Le piastrine sintetizzano il trombossano.
NB: COX1 è espressa costitutivamente (i suoi prodotti hanno funzione omeostatica) ma, durante il processo infiammatorio, viene indotta l'espressione di COX2 che produce mediatori pro-infiammatori.
 - Lipossigenasi: si originano leucotrieni (LTC₄, LTD₄, LTE₄), che determinano vasocostrizione bronchiale, e lipossine, che inducono vasodilatazione e hanno azione anti-infiammatoria.
- PAF: deriva dai fosfolipidi di membrana. Determina vasodilatazione e l'aumento sia della permeabilità vascolare che dell'adesione leucocitaria.
- Ossido nitrico: è un mediatore della fagocitosi. All'interno del fagolisosoma, la sua produzione ha azione microbica. È sintetizzato dagli enzimi iNOS (inducibile) ed eNOS (nelle cellule endoteliali).

Mediatori plasmatici → il fegato sintetizza proteine e le rilascia in circolo.

- Sistema del complemento: ha funzione di lisi (tramite la formazione del MAC), di fagocitosi (tramite opsonine) e effettrice (tramite anafilossine).
- Trombina: in caso di danno endoteliale, viene attivato il fattore XII. Questo, a cascata, porta alla formazione di trombina dalla protrombina. La trombina idrolizza il fibrinogeno in fibrina. La trombina ha anche

azione pro-infiammatoria in quanto si lega ai recettori di varie cellule, attivandole.

- Via delle chinine: il fattore XII attivato determina anche la produzione di chinine, tra cui la bradichinina.

Una volta formato l'essudato, i primi mediatori a essere rilasciati sono: istamina, serotonina, bradichinina e la via del complemento. Successivamente intervengono i metaboliti prodotti dalla via dell'acido arachidonico. In un terzo momento intervengono le citochine dell'immunità innata. In caso di stimoli forti, vengono prodotte elevate concentrazioni di citochine; avranno, quindi, un importante effetto sistemico sia protettivo (reazione di fase acuta e febbre) che dannoso (shock settico).

RIPARAZIONE TISSUTALE

L'infiammazione acuta può evolvere nell'eliminazione dello stimolo lesivo e nella riparazione tissutale o nell'infiammazione cronica (qualora lo stimolo non venga rimosso). Anche in quest'ultimo caso, però, si va incontro a una riparazione.

È possibile distinguere tre tipologie di cellule: cellule labili (hanno vita breve e vanno continuamente incontro a sostituzione), cellule stabili (hanno vita lunga e vanno incontro a divisione solo in caso di danno) e cellule perenni (una volta danneggiate, vengono perse perché non è possibile sostituirle).

La riparazione può avvenire tramite due meccanismi:

- Rigenerazione → se si verifica un danno lieve, i tessuti possono rimpiazzare le componenti iniziali danneggiate.
- Guarigione → i tessuti non sono capaci a rimpiazzare le cellule danneggiate ed il tessuto danneggiato viene sostituito da tessuto connettivo, con conseguente formazione di una cicatrice. In questo processo svolgono un ruolo essenziale i macrofagi: grazie ai segnali find-me e eat-me, i macrofagi fagocitano i corpi apoptotici. Si verifica uno switch verso l'isotipo M2, che ha azione anti-infiammatoria e favorisce la sintesi dei mediatori SPM (derivati dai PUFA tramite la via dell'acido arachidonico).
 - Ferite cutanee: in caso di un essudato ricco di fibrina (danno esteso), si avvia il processo di cicatrizzazione che ha origine con la sintesi del tessuto di granulazione. Le cellule situate nel tessuto danneggiato, tramite fattori di crescita, producono matrice extracellulare e VEGF (per la formazione di nuovi vasi). Inoltre, le sostanze rilasciate dai macrofagi M2 (TGF-β) favoriscono la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti, che depositano matrice extracellulare. Dato che non si possono rigenerare gli elementi costitutivi del tessuto danneggiato, questo va incontro a rimodellamento: i vasi si ritirano e, alla fine, il tessuto sarà costituito solo da ECM. Si origina così il tessuto di granulazione. L'ECM della lamina basale è costituita da collagene di tipo IV, proteoglicani e laminina (struttura bidimensionale); in questo caso, invece, l'ECM è formata da proteoglicani, ialuronani ed elastina (struttura tridimensionale disorganizzata).
 - ✓ Guarigione per prima intenzione: infiammazione meno intensa, minore tessuto di granulazione, cicatrice meno estesa.
 - ✓ Guarigione per seconda intenzione: infiammazione più intensa, maggiore tessuto di granulazione, cicatrice più estesa.

MANIFESTAZIONI SISTEMICHE DELL'INFIAMMAZIONE

- Proteine della fase acuta → durante l'infiammazione, cambia l'attività biosintetica del fegato. Se le citochine dell'immunità innata sono prodotte a bassa concentrazione, si avrà un effetto locale; se la loro concentrazione è elevata, si attiva la fase acuta.

Le proteine positive della fase acuta vengono prodotte in quantità maggiori, mentre le proteine negative della fase acuta vengono prodotte in quantità minori. Le proteine positive/negative, per essere definite tali, devono subire un incremento/decremento della concentrazione almeno del 25%.

Le proteine positive della fase acuta vengono aumentate perché hanno un ruolo difensivo: neutralizzano i patogeni e promuovono la riparazione tissutale.

- Fattori della coagulazione.
- Proteine leganti metalli.
- Proteine del complemento.
- Inibitori delle proteasi.
- PCR: appartiene alla famiglia delle pentrassine (come la SAP), che hanno struttura pentamerica anulare. È una proteina di riconoscimento che forma legami calcio-dipendenti con diversi substrati. Agisce da opsonina ed è in grado di attivare la via classica del complemento.

La sua produzione raggiunge il picco dopo 9h e diminuisce entro le 18h ad opera di TGF- β (prodotta durante la chiusura della risposta infiammatoria).

È la più utilizzata perché non va incontro a processi di sequestro e degradazione. In particolare, è utilizzata come marcatore per l'infarto. Infatti, le placche aterosclerotiche a livello delle coronarie possono rompersi e causare l'infarto. Alti livelli di PCR sono indice di instabilità delle placche, dovuta all'attività dei macrofagi. Se, invece, in un individuo infartuato i livelli di PCR si abbassano, vuol dire che è in remissione. Se non si abbassa, allora c'è il rischio che si verifichi un secondo evento ischemico (valore prognostico).

- SAP: appartiene alla famiglia delle pentrassine (come la PCR). Ha un'azione simile alla PCR, ma non è in grado di favorire l'opsonizzazione. È in grado di bloccare il reclutamento dei neutrofili e raggiunge il picco in 24/36h.

NB: Non è usata come marcatore.

- SAA: è un'apolipoproteina e favorisce la riparazione del danno. Lega l'LPS ed è in grado di regolare l'interazione tra linfociti T e macrofagi. È indotta da IL-1 e TNF.

L'incremento nel tempo delle proteine permette l'utilizzo delle stesse come marcatori di laboratorio della fase acuta.

L'errato catabolismo delle proteine prodotte in eccesso porta alla formazione di amiloidi, che si depositano a livello tissutale.

NB: Nelle infiammazioni croniche la persistenza di SAA e SAP (formano depositi amiloidi) può portare ad amiloidosi secondaria.

- Febbre → è una risposta protettiva dell'organismo: aumenta la temperatura con lo scopo di rendere l'ambiente inospitale ai patogeni.

La termoregolazione è la capacità di regolare la temperatura tramite termogenesi (calore prodotto dall'organismo) e termodispersione (calore ceduto dall'organismo) allo scopo di mantenerla costante.

In caso di febbre, l'aumento della temperatura corporea si verifica in concomitanza ad un aumento del settaggio della temperatura a livello ipotalamico (nell'ipertermia questo non accade).

Se i neuroni W rilevano una temperatura superiore a quella del set-point, viene attivata una risposta termodispersiva (neuroni w). Se i neuroni W rilevano una temperatura inferiore a quella del set-point, viene attivata una risposta termoconservativa (neuroni c).

- Decorso: si possono distinguere tre fasi.

- ✓ Fase di insorgenza: cambia il set-point a livello ipotalamico ed è contraddistinta dal brivido.
 - ✓ Fase di persistenza: la temperatura corporea aumenta e scompare la sensazione di freddo.
 - ✓ Fase di defervescenza: il set-point ritorna al valore originale e avvengono i meccanismi termodispersivi (sudorazione).
 - Tipo di febbre: in base alle cause che la determinano la febbre, l'andamento della febbre può variare.
 - ✓ Febbre intermittente: è caratterizzata da fasi di innalzamento e abbassamento termico ed è tipica della malaria.
 - ✓ Febbre remittente: durante la fase di persistenza l'aumento della temperatura subisce oscillazioni di un grado.
 - ✓ Febbre ricorrente e ondulante: è caratterizzata da un continuo rialzo termico di alcuni giorni seguito da giorni di apiressia. È tipico dei tumori.
 - Eziopatogenesi: in seguito all'applicazione di uno stimolo ad un animale di laboratorio vennero identificati i pirogeni esogeni (PAMP) e pirogeni endogeni (citochine infiammatorie). Questi ultimi sono quelli che portano alla febbre. Infatti, i geni per le citochine vengono trascritti e, una volta prodotte, in parte determinano la risposta di fase acuta ed in parte raggiungono i nuclei della regione pre-ottica, dove le cellule attivano la via dell'acido arachidonico. Le cellule della regione ipotalamica, per opera di NFκB, esprimono COX2 e la prostaglandina sintetasi microsomale: viene sintetizzata PGE₂, mediatore della febbre. Infatti, innalza la temperatura. I farmaci antipiretici, quindi, agiscono inibendo COX2 e la prostaglandina sintetasi microsomale.
- NB:** In alcuni casi il rialzo febbrile è molto rapido e non può essere spiegato tramite questo processo. Si pensa che possa esistere un altro meccanismo legato alla stimolazione vagale. In questo caso le cellule di Kuffer processano i pirogeni esogeni e producono localmente PGE₂.

- Leucocitosi (aumento dei globuli bianchi nel sangue).

Le citochine hanno una funzione fisiologica protettiva ma, se aumentano in concentrazione, generano manifestazioni sistemiche.

IPERSENSIBILITÀ DI I TIPO (reazione allergica)

Lo stimolo determina la produzione di IgE, la cui branca effettrice sono mastociti, eosinofili e basofili.

- IgE e recettori FcεR → le IgE sono normalmente prodotte in piccole quantità, hanno emivita breve e vengono sequestrate dal recettore ad alta affinità FcεRI presente su mastociti (cellule residenti) e basofili (cellule circolanti). Esiste anche il recettore a bassa affinità FcεRII espresso dagli eosinofili, reclutati in un momento successivo. Fisiologicamente le IgE intervengono in presenza di parassiti ed elminti, ma nei paesi industrializzati questa risposta viene attivata da allergeni (sostanze innocue).
- Reazione → vede principalmente due fasi.
 - Sensibilizzazione: l'allergene viene presentato dalle APC ai linfociti T CD4 vergini, determinandone il differenziamento verso la sottopopolazione Th-2, che produce:
 - ✓ IL-4, che favorisce l'espansione clonale dei Th-2.
 - ✓ IL-5, che determina il reclutamento tardivo degli eosinofili.
 - ✓ IL-13, che induce i linfociti B a produrre IgE e IgG4. Le IgE prodotte si legano a mastociti e basofili.

Questa fase è asintomatica.

- Reazione immediata: quando l'allergene si ripresenta, si lega a due IgE determinando la degranolazione di mastociti e basofili. Mastociti e basofili, oltre a liberare i mediatori pre-formati, attivano le vie dell'acido arachidonico portando alla produzione di:
 - ✓ LTC₄, LTD₄, LTE₄ (leucotrieni): contrazione della muscolatura liscia a livello dei bronchi (broncocostrizione) e aumento della permeabilità vascolare.
 - ✓ LTB₄: recluta eosinofili, neutrofilo e monociti.
 - ✓ PGD₂: causa aumento della secrezione mucosa.
 - ✓ PAF: causa aggregazione piastrinica, vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare.
 - ✓ Citochine.

- Reazione tardiva: il microambiente citochinico generatosi determina il reclutamento degli eosinofili. Questi degranulano e reclutano macrofagi M2

Un ruolo molto importante è svolto dalle ILC-2 e dai Th-9. Questi ultimi si generano per induzione da parte di IL-2, IL-4 e TGF-β.

▪ Manifestazioni cliniche locali →

- Asma bronchiale (apparato respiratorio): è caratterizzato da ostruzione intermittente e reversibile delle vie respiratorie, da infiammazione bronchiale con infiltrato eosinofilo e ipertrofia della muscolatura liscia a livello dei bronchi. L'asma può essere:
 - ✓ Estrinseco: derivato da una reazione di ipersensibilità di I tipo.
 - ✓ Intrinseco: non è coinvolto nessun meccanismo patogenetico, nonostante le manifestazioni siano uguali. Può essere innescato da farmaci o infezioni polmonari.

È una malattia infiammatoria cronica ed è importante curarlo affinché si possa interrompere il circuito che lo determina.

Tra i mediatori prodotti dalle cellule infiltranti, c'è IL-13 che, oltre a favorire lo switch isotipico verso le IgE, stimola le cellule calciformi a produrre muco; inoltre, in seguito al coinvolgimento degli eosinofili e alla loro degranolazione, la mucosa viene distrutta. Questa condizione può peggiorare con la formazione di un tessuto di transizione mesenchimale (fisiologico in caso di embriogenesi o guarigione da ferite): le cellule mesenchimali sono totipotenti e possono trasformarsi in linee cellulari diverse.

- Eczema da Der p1 (cute): è una reazione dermica infiammatoria pruriginosa e non contagiosa. In caso di biopsia si possono identificare gli eosinofili presenti nell'infiltrato tramite una colorazione con ematosilina. Alternativamente, si può trattare con anticorpi per riconoscere la proteina basica maggiore.
- Orticaria (cute): caratterizzata da edema in spazi perivascolari del derma superficiale.
- Angioedema: caratterizzata da edema profondo (sottocute/sottomucosa).

▪ Manifestazione sistemica →

- Anafilassi: essendo una reazione sistemica, i sintomi devono presentarsi in almeno 3/4 distretti corporei. I più comuni sono di tipo cutaneo, respiratorio, gastrointestinale e cardiovascolare. I metaboliti delle vie dell'acido arachidonico prodotti in elevate quantità hanno effetto vasodilatatore e aumentano la permeabilità vascolare. È importante somministrare subito epinefrina, oltre ad antistaminici e corticosteroidi, per aumentare la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa.

- Diagnostica → esiste il prick test, che prevede l'effettuazione di una scarificazione. Si aggiunge l'allergene e, in caso di positività, si generano arrossamento e gonfiore (Es. pomfo eritematoso).
- Terapia ipo-sensibilizzante → la risposta Th2-dipendente porta alla produzione di IgE e IgG4 ad opera di IL-4. Tuttavia, in un microambiente ricco di IL-10, si ha una maggiore sintesi di IgG4. Quindi, lo scopo della terapia è generare un ambiente ricco di IL-10; questo lo si può ottenere

tramite la somministrazione in dosi sempre crescenti, per alcune settimane, dell'allergene. Si induce, così, la produzione di IgG4 specifiche e la polarizzazione della risposta verso i Th-1. Le IgG, in questo modo, reagiscono con l'allergene impedendone il legame alle IgE.

IPERSENSIBILITÀ DI II TIPO (citolitica o citotossica)

Le reazioni di ipersensibilità di II tipo sono provocate dalla reazione di IgG e IgM con antigeni espressi sulle superfici cellulari. L'ipersensibilità è determinata dall'eccessiva produzione di elementi del complemento e dall'eccessiva attivazione di cellule effettrici.

- **Reazione** → quando l'anticorpo lega l'antigene, viene attivato il complemento. Quindi, si verificano: il fenomeno di opsonizzazione, la formazione del MAC e di anafilossine. I neutrofili, tramite i recettori per il complemento e per Fc, vengono reclutati ed effettuano la fagocitosi. In caso di ipersensibilità, il recettore effettua il riconoscimento, ma il neutrofilo non è in grado di fagocitare. Avviene la fagocitosi frustrata: il neutrofilo libera il contenuto dei granuli e gli enzimi liberati, non trovandosi in ambiente protetto, causano danno tissutale.
- **Reazioni trasfusionali** → sulla membrana degli eritrociti si possono trovare gli antigeni A/B/0 di natura carboidratica. Sul NAG-galattosio, tramite la fucosil-transferasi, viene trasferito il fucosio e, a seguire, può essere aggiunta N-acetilglucosamina (A) o galattosio (B).
gli individui si dividono in quattro gruppi sanguigni: A (antigeni A, anticorpi B), B (antigeni B, anticorpi A), AB (antigeni A e B, nessun anticorpo), 0 (nessun antigene, anticorpi A e B).
Trattandosi di polisaccaridi, gli anticorpi coinvolti appartengono alle IgM.
Questo tipo di reazione è rara, ma quando si verifica la reazione avviene rapidamente perché le IgM sono già presenti; le conseguenze sono agglutinazione, attivazione del complemento ed emolisi (si libera emoglobina).
- **Incompatibilità materno-fetale** → è legata agli antigeni del sistema Rh. I determinanti antigenici del sistema Rh sono gli antigeni C, D ed E.
L'antigene D è il più immunogeno e può determinare la sintesi di IgG nel ricevente.
La maggior parte della popolazione è RhD⁺ e la reazione si verifica perlopiù tra madri RhD⁻ e feti RhD⁺. La madre non possiede anticorpi anti-D fino alla sensibilizzazione, che si verifica durante il parto, quando il sangue RhD⁺ entra a contatto con quello materno RhD⁻. Dunque, la madre produce IgG e si immunizza. In caso di seconda gravidanza, se il feto è nuovamente RhD⁺, le IgG materne attraverseranno la placenta e attaccheranno i globuli rossi fetali. Si verifica un'emolisi extra-vascolare (degradazione dei globuli rossi a livello di fegato e milza ad opera di cellule con azione fagocitica) con conseguente ingrossamento di fegato e milza.
 - **Profilassi con Rhogam**: al momento del parto viene somministrato alla madre l'anticorpo anti-D. In tal modo la madre non può sensibilizzarsi e non può produrre le IgM.
 - **Test di Coombs**: sfrutta anticorpi anti-human. Aggiungendo il siero di Coombs in vitro, si verifica agglutinazione e vuol dire che sull'eritrocita fetale ci sono anticorpi materni. il test di Coombs indiretto si effettua sul siero materno prima della seconda gravidanza. Si tratta con emazie RhD⁺ e si aggiunge il siero di Coombs.
- **Sindrome di Goodpasture** → malattia autoimmune in cui sono presenti anticorpi contro antigeni self sul collagene di tipo IV. Il collagene forma doppie eliche, si organizza in trimeri che formano una rete in cui le teste globulari prendono contatto. Uno dei principali bersagli è la membrana basale glomerulare nel rene e causa nefrite.
- **Pemfigo bolloso** → malattia autoimmune in cui gli anticorpi legano le desmogleine, molecole di adesione delle cellule epiteliali o delle mucose.
- **Miastenia Gravis** → vengono prodotti anticorpi contro il recettore per l'ACh, ne consegue la paralisi.

IPERSENSIBILITÀ DI III TIPO

Le reazioni di ipersensibilità di II tipo sono provocate dalla reazione di IgG con antigeni solubili, cui consegue la formazione di immunocomplessi.

- Reazione → gli anticorpi reagiscono con antigeni solubili e si generano immunocomplessi. Si può formare un precipitato che, però, dipende dalle concentrazioni dell'antigene.
 - In vitro:
 - ✓ In caso di eccesso di antigeni, si formano complessi piccoli incapaci di generare un precipitato visibile.
 - ✓ Se l'antigene non è in eccesso, esso si lega a siti di più anticorpi favorendo la formazione di una rete e, quindi, di un precipitato visibile.
 - ✓ Se l'antigene è troppo poco, si formano pochissimi immunocomplessi e il precipitato non si forma.
 - In vivo: gli anticorpi legano l'antigene e lo eliminano tramite meccanismi effettori, come l'attivazione del complemento. Il C3b si deposita sugli immunocomplessi e viene riconosciuto dal recettore CR1 presente sui globuli rossi che, passando attraverso il fegato e la milza, presentano gli immunocomplessi ai macrofagi. I globuli rossi che hanno svolto questa funzione perdono il recettore CR1 e, quindi, non possono ripetere il processo. In caso di reazione di ipersensibilità, il danno tissutale è causato dal fatto che il complemento non funziona e gli immunocomplessi non possono essere rimossi: dunque, si depositano in varie zone dell'organismo. Le zone preferenziali sono i punti di biforcazione dei vasi (anomalie del flusso), le regioni di filtrazione (rene) e le articolazioni. Gli immunocomplessi possono poi interagire con i granulociti o con cellule esprimenti Fcγ: si innesca una reazione infiammatoria che danneggia i tessuti.
- Alveolite allergica estrinseca → si manifesta a livello polmonare, dove si formano anticorpi verso gli antigeni inalati. Un esempio sono gli antigeni derivanti dal fungo del fieno: si legano agli anticorpi e si genera una risposta caratterizzata da necrosi dell'alveolo polmonare.
- Reazione di Arthus → è una reazione cutanea che si ottiene negli animali da laboratorio in seguito a ripetute immunizzazioni. Dopo i cicli di immunizzazione, un'iniezione dell'antigene porta alla formazione di immunocomplessi che richiamano le cellule immunitarie con conseguente reazione infiammatoria e necrosi.

IPERSENSIBILITÀ DI IV TIPO

È legata all'attivazione di una risposta cellulo-mediata. Si ha una fase di sensibilizzazione asintomatica durante la quale le APC presentano l'antigene ai linfociti T vergini e si ha espansione clonale delle sottopopolazioni Th-1, Th-17 e linfociti T CD8 (citotossici). Nel caso l'antigene si ripresenti, si avrà il reclutamento delle cellule effettrici e, successivamente, il danno tissutale.

- Tipologie → esistono diverse tipologie di reazioni di ipersensibilità di IV tipo.
 - Ipersensibilità da contatto: gli antigeni come il nickel, per avviare una risposta immunitaria, si devono coniugare ad altre proteine. Il complesso che si forma genera una risposta da parte del sistema immunitario e si attiva una risposta di ipersensibilità che si risolve in 48-72h. Alla fine si osserva una lesione eczematosa (infiltrato di macrofagi, branca effettrice delle cellule Th-1).
 - ✓ Patch test: mette in evidenza i casi di eczema da contatto. Si applica un cerotto che contiene l'antigene e dopo tre giorni lo si rimuove per vedere la presenza dell'eczema.
 - Ipersensibilità alla tubercolina: è un test di screening che consiste nell'iniezione, a livello del derma, dell'antigene per vedere se il soggetto è stato a contatto col micobatterio della tubercolosi (in circa tre giorni si formerà una reazione cutanea caratterizzata da infiltrato

cellulare macrofagico). È una reazione indurativa in quanto si forma un pomfo eritematoso indurativo (diverso da quello delle reazioni di ipersensibilità di tipi I).

Varianti clinico-patologiche della tubercolosi:

- ✓ Tubercolosi primaria, che si sviluppa in soggetti non precedentemente sensibilizzati (infezione contenuta).
- ✓ Tubercolosi secondaria, che si verifica dopo molti anni dalla primaria. Può essere dovuta alla riattivazione di un'infezione latente o alla re-infezione: è localizzata all'apice dei lobi superiori dei polmoni e può portare a tisi, cioè alla cavitazione di una regione polmonare attraverso cui possono diffondere i germi (forma contagiosa tramite tosse).
- Reazioni granulomatoze: è dovuta alla persistenza del patogeno all'interno del citoplasma dei macrofagi. Nell'arco di tre settimane si forma un granuloma per opera di IFN- γ . Il patogeno, in questo caso, non può diffondere ma determina ipersensibilità e danno tissutale.

MECCANISMI DI MANTENIMENTO CELLULARE

Le cellule dell'organismo si possono dividere in cellule labili (elevata capacità rigenerativa ed elevato turnover), cellule stabili (buona capacità rigenerativa e basso turnover) e cellule perenni (nessuna capacità rigenerativa).

Quando una cellula è sottoposta ad un forte stress, va incontro ad apoptosi o necrosi. Se lo stress non è forte, cambia la richiesta fisiologica e la cellula tende a adattarsi tramite:

- Ipertrofia: aumento delle dimensioni (Es. massa muscolare degli atleti).
- Iperplasia: aumento delle divisioni cellulari (Es. ghiandola mammaria in pubertà/gravidanza/allattamento).
- Atrofia: riduzione delle dimensioni.
- Metaplasia: le cellule cambiano fenotipo, ma originano sempre dallo stesso progenitore. Le cellule sostitutive sono più resistenti ad un determinato stress rispetto a quelle originarie.

Esiste anche l'ipoplasia, simile per certi versi all'atrofia. Non si tratta, però, di un meccanismo di adattamento ma di un difetto morfogenetico (mancato sviluppo di un organo).

DIFFERENZIAMENTO

Il differenziamento è il processo che, a partire dai precursori, porta le cellule ad assumere uno specifico fenotipo.

- Metaplasia → in seguito a stress, la cellula mette in atto un meccanismo protettivo che la porta ad assumere un nuovo fenotipo, vicino dal punto di vista differenziativo a quello delle cellule originarie.

Un esempio è la metaplasia squamosa dovuta al continuativo contatto con le sostanze nocive contenute nelle sigarette. Le cellule della mucosa respiratoria, infatti, si modificano e l'epitelio respiratorio colonnare ciliato diventa un epitelio squamoso stratificato.

Si tratta di una risposta reversibile: qualora lo stimolo che la genera viene eliminato, le cellule possono riacquisire il fenotipo primario. Se, invece, lo stimolo perdura, la metaplasia può evolvere in displasia.

- Displasia → in presenza di stimoli nocivi, le modifiche che subisce la cellula la portano ad allontanarsi sempre di più dal proprio fenotipo. Si verifica un vero e proprio meccanismo de-differenziativo. La displasia può essere classificata in lieve, moderata e severa. È reversibile agli stadi iniziali; quando diventa severa, le lesioni sono considerate pre-cancerose.
- Neoplasia → si verifica quando tutte le caratteristiche della displasia diventano esasperate.

TUMORI

Il tumore è una lesione derivante da una crescita anomala di cellule che persiste anche dopo la rimozione dello stimolo nocivo che l'ha causata.

La massa tumorale è distinguibile in:

- ❖ Parenchima: cellule tumorali.
- ❖ Stroma: cellule inizialmente reclutate a scopo difensivo che, tramite il rilascio di mediatori, favoriscono le cellule tumorali.

Lo stroma può essere vascolarizzato con lo scopo di nutrire la massa tumorale.

Le caratteristiche istologiche sono anaplasia (assenza di differenziamento) e pleomorfismo.

L'oncogenesi può avere origine sia da cellule differenziate che da cellule staminali tissutali.

È difficile determinare il confine tra displasia e neoplasia: infatti, displasia severa e carcinoma in situ sono neoplasie intraepiteliali (non hanno metastasi).

- Monoclonalità dei tumori → i tumori originano da un'unica cellula che ha accumulato diverse mutazioni su geni chiave (oncogeni, oncosoppressori, fattori di crescita ecc). Ciò è stato dimostrato considerando il fenomeno di inattivazione del cromosoma X: i marcatori del cromosoma X sono tutti uguali in una progenie di cellule tumorali.
- Tasso di crescita e progressione tumorale → le cellule normali sottoposte ad agenti cancerogeni diventano tumorali. Le cellule tumorali, poi, in base all'ambiente acquisiscono caratteristiche diverse e, quindi, eterogeneità.

La progressione tumorale è definibile come acquisizione di eterogeneità da parte delle cellule figlie dell'unica cellula trasformata inizialmente.

- Vie metastatiche → la metastatizzazione è una delle azioni messe in atto dal tumore maligno, e lo può fare attraverso diverse vie:
 - Via ematica: attraverso cui le cellule neoplastiche possono raggiungere organi distali.
 - Via linfatica: tramite i vasi linfatici le cellule neoplastiche possono essere drenate ai linfonodi più vicini. Per questo motivo in caso di tumore al seno si effettua la biopsia del linfonodo sentinella.
 - Via transcelomatica: le cellule neoplastiche rimangono nelle cavità chiuse come pleura, pericardio, peritoneo.
 - Impianto accidentale: dovuto, ad esempio, a intervento chirurgico.
- Fasi della metastatizzazione → prevede 4 tappe.
 - Distacco delle cellule: si perdono i contatti cellula-cellule (Es. APC libera la β -catenina e la E-caderina si dissocia).
 - Produzione di enzimi: le cellule neoplastiche producono metalloproteinasi e catepsine.
 - Liberazione di sostanze trofiche: in seguito a lesione le sostanze trofiche della MEC vengono liberate e sfruttate dal tumore.
 - Sito di impianto: il sito della metastasi può essere predetto osservando il letto capillare più vicino al tumore primario. In alcuni casi si verifica tropismo: vengono prodotti mediatori che favoriscono il richiamo delle cellule.
- Meccanismi di sviluppo delle metastasi → è un processo complesso determinato da diversi fattori.
 - La capacità di metastatizzare è insita nelle cellule che hanno subito trasformazione neoplastica.
 - Produzione di enzimi e mediatori.
 - Le cellule dell'infiltrato cellulare (stroma) sostengono il tumore rilasciando fattori che ne favoriscano la metastatizzazione.

- **Cancerogenesi** → la trasformazione in una cellula neoplastica è dovuta a mutazioni, le quali possono dipendere da agenti chimici, fisici, biologici. Si distinguono:

- Agenti cancerogeni.
- Agenti promuoventi: senza di essi l'agente cancerogeno non è in grado di dare vita al tumore.

È stato studiato anche il modo in cui le due sostanze, cancerogena e promuovente, devono essere somministrate per dare vita al tumore: prima si deve somministrare l'agente cancerogeno e soltanto dopo quello promuovente. Quest'ultimo favorisce la formazione del tumore solo se somministrato ad intervalli regolari e ravvicinati immediatamente dopo all'agente cancerogeno o a distanza di tempo.

Le mutazioni avvengono a carico di quattro tipologie di geni:

- **Oncogeni:** basta l'alterazione di una delle due copie alleliche affinché si sviluppi il fenotipo maligno. L'oncogene si comporta in un modo in cui non dovrebbe comportarsi. Esempi di oncogeni sono quelli per i fattori di crescita, per i recettori dei fattori di crescita, per le proteine coinvolte nella trasduzione del segnale ecc.
- **Oncosoppressori:** è necessaria l'alterazione di entrambe le copie alleliche affinché si sviluppi il fenotipo maligno. L'oncosoppressore perde la propria funzione biologica. Può capitare che gli oncosoppressori siano già mutati nella linea germinale e che, quindi, basti una sola mutazione perché si manifesti il fenotipo maligno. Esempi di oncosoppressori sono p53 (coinvolta nei meccanismi di quiescenza e senescenza fino all'apoptosi), BRCA1 e BRCA2 (sono coinvolti nella riparazione dei danni al DNA).
- Geni che regolano l'apoptosi.
- Geni che regolano la riparazione del DNA.

- **Patogenesi** →

- **Retinoblastoma:** l'insorgenza nella popolazione è piuttosto rara. Perché generalmente ne sono affette persone che presentano una copia già mutata nella linea germinale.
- **Carcinoma del colon-retto:** affinché insorga si devono verificare diverse mutazioni, tra cui:
 - ✓ Inattivazione dell'APC: causa iperplasia.
 - ✓ Attivazione di Ras: causa displasia.
 - ✓ Inattivazione DCC: causa cancro in situ.
 - ✓ Inattivazione di p53: causa cancro invasivo.
 - ✓ Amplificazione di MET: causa la metastatizzazione.
- **Melanoma:** una mutazione puntiforme a carico del gene BRAF causa la sostituzione della valina con acido glutammico.
- **Virus che causano neoplasie:**
 - ✓ **Papilloma virus:** uno dei meccanismi utilizzati dai ceppi 16 e 18 pi HPV sfrutta l'integrazione del genoma virale all'interno del genoma dell'ospite. È possibile effettuare un test diagnostico estraendo il DNA da un prelievo della cervice uterina e usando una sonda per valutare l'integrazione del genoma virale. Esistono anche ceppi meno aggressivi il cui genoma si trova in forma episomale. HPV sintetizza le oncoproteine E6 (media la degradazione delle proteine pro-apoptotiche p53 e BAX e attiva la telomerasi) ed E7 (lega l'oncosoppressore RB e inattiva gli inibitori delle cicline).
 - ✓ **HBV/HCB:** causano l'epatite. Il loro effetto oncogeno è multifattoriale, ma quello principale è l'infiammazione cronica.
 - ✓ **Epstein-Barr virus:** il virus non è sufficiente affinché insorga la malattia. Servono condizioni ambientali specifiche che ne permettono lo sviluppo. Il linfoma di Burkitt è molto diffuso in Africa, dove le condizioni igieniche sanitarie sono scarse, e si assiste

alla traslocazione 8-14 e all'alterazione del fattore di trascrizione oncogenico c-myc. Il virus HBV viene riconosciuto dal recettore CD21 sul linfocita B determinando espansione clonale.

- ✓ *Helicobacter pylori*: è associato a tumori della mucosa gastrointestinale. La modalità di trasmissione è oro-orale/oro-fecale.

Il batterio si localizza sullo strato di muco che riveste la mucosa e gastrica e causa molto spesso ulcere duodenali. La virulenza del batterio è determinata da: flagelli, ureasi (genera ammoniaca), adesine, esotossine, LPS, enzimi litici.

Questo tipo di infezione genera metaplasia. Per la diagnosi si effettua il test del respiro e si verifica la presenza di urea. Nel caso questa sia presente si procede con gastroscopia e biopsia.

INFIAMMAZIONE E CANCRO

Le cellule cancerose presentano una serie di processi alterati:

- Insensibilità ai segnali contrari alla crescita → continua a stimolare la crescita anche quando non ce n'è bisogno.
- Evasione dell'apoptosi → non riuscendo ad andare incontro ad apoptosi, le cellule danneggiate vengono mantenute.
- Effetto Warburg → vi è una disregolazione anche a livello energetico, in quanto le cellule effettuano glicolisi anaerobia.
- Innesco dei processi di angiogenesi.
- Meccanismi di invasione e metastasi.
- Capacità replicativa senza controllo.
- Difetti nella riparazione del DNA (BRCA1/BRCA2).
- Attivazione dell'infiammazione → questo meccanismo è indotto dallo stroma tumorale

Quando si parla di infiammazione e cancro è possibile distinguere una via intrinseca (modificazioni a carico di oncogeni e oncosoppressori importanti per l'infiammazione) e una via estrinseca (l'infiammazione è scatenata dalle cellule dello stroma che assumono attività pro-tumorale)

ANGIOGENESI

L'angiogenesi prevede cinque fasi: l'ossido di azoto determina vasodilatazione, cui segue un aumento della permeabilità vascolare, la migrazione delle cellule endoteliali verso la zona danneggiata, proliferazione cellulare e reclutamento dei periciti.

Nel caso dei tumori, il meccanismo angiogenetico è inizialmente messo in atto dalle cellule tumorali e, in seguito, è sostenuto dalle cellule dello stroma. Vengono rilasciati dei fattori di crescita, tra cui VEGF, in grado di mobilitare le cellule staminali midollari che costituiranno l'endotelio e determinare la gemmazione dei vasi che già si trovano nella regione.

Nel tumore si parla di switch angiogenico quando il tumore raggiunge delle dimensioni (1-2 mm), in cui è necessario che abbia un apporto ematico indipendente da quello del tessuto dove risiede. Lo switch angiogenico è determinato dalla produzione di VEGF da parte delle cellule tumorali (tramite l'attivazione di oncogeni come Ras e myc).

Normalmente ci sono anche fattori anti-angiogenetici, tra cui TSP-1 (trombospondina-1) che lega i recettori CD36 e il CD47 contrastando la troppa produzione di VEGF da parte del tumore. Infatti, quando la cellula tumorale raggiunge il tessuto in cui metastatizzare, non è detto che lo faccia.

Infatti, se l'ambiente è regolato, la cellula metastatica non riesce subito a proliferare e rimane dormiente. Se, poi, questo ambiente perde la condizione di omeostasi, la cellula prolifera.

Di VEGF esistono diverse isoforme in grado di interagire con diversi recettori. VEGF-R1 e VEGF-R2 favoriscono l'angiogenesi vascolare, VEGF-R3 media l'angiogenesi dei vasi linfatici.

La rete vascolare che viene prodotta è anormale, perché i vasi associati al parenchima tumorale sono ampiamente disregolati e privi di periciti (endotelio fenestrato).

INFILTRATO TUMORALE

Per capire quali cellule si possono trovare nell'infiltrato tumorale, sono stati condotti studi per identificare i marcatori sulla superficie cellulare. Fra le cellule infiltrate ci sono:

- TAM (macrofagi associati a tumori) con isotipo M2 → queste cellule, in condizioni fisiologiche, rilasciano fattori di crescita per la riparazione tissutale. In un ambiente tumorale, però, i fattori di crescita hanno funzione pro-tumorale. Producono nell'infiltrato cellulare metalloproteasi, che degradano la matrice extracellulare per crearne una nuova. La matrice extracellulare è piena di fattori di crescita e chemochine, quindi la sua degradazione porta alla loro liberazione. Inoltre, producono i ROS
- TAN (neutrofili associati ai tumori) → hanno un impatto nell'aumento dell'angiogenesi e metastatizzazione.
- MDSC (cellule mieloidi ad attività soppressoria nei confronti dei linfociti T) → ne esistono due sottopopolazioni, le PMN-MDSC (tessuti periferici) e le M-MDSC (sito tumorale).
- Cellule staminali che sopprimono le risposte T-dipendenti.
- Monociti → esprimono il recettore per l'angiopoietina, che contribuisce all'angiogenesi.
- Mastociti → producono prostaglandine e citochine per l'amplificazione della risposta infiammatoria.
- Cellule endoteliali → sono associate ad una cattiva prognosi.
- Progenitori di cellule endoteliali.

ANTICORPI

Gli anticorpi hanno delle zone cardine che permettono alle regioni Fab che legano l'antigene di muoversi rispetto alla regione Fc, sede delle funzioni effettrici.

Le regioni Fab possono formare angoli da 0° a 90° e ciò dipende dall'interazione con l'antigene. La maggior parte delle funzioni degli anticorpi è legata al frammento Fc, ma d'altra parte il riconoscimento dell'antigene può essere una funzione effettrice: infatti, impedisce all'antigene di reagire con altre strutture self e propagarsi nell'organismo.

Le catene pesanti e leggere delle Ig hanno delle regioni a α -elica e delle zone a β -foglietto. Queste ultime sono quelle interne che, nelle regioni variabili, costituiscono le tasche di legame per l'antigene. L'antigene, più precisamente l'epitopo, prende fisicamente contatto con le regioni ipervariabili CDR1, CDR2 e CDR3. In una regione Fab ce ne sono 3 nella catena costante e 3 nella catena leggera (6 in totale) e sono giustapposte a formare l'intero sito che lega il determinante antigenico.

I determinanti antigenici possono essere riconosciuti dalla regione Fab degli anticorpi in base al folding o alla struttura lineare. Può anche succedere che delle proteine deteriorate esponano degli epitopi inespressi nella molecola nativa (neoepitopi).

I legami che si instaurano tra antigene e anticorpo sono legami deboli.

- Affinità → è l'interazione del singolo epitopo col singolo paratopo e dipende dai legami reversibili che si instaurano tra i due attori. Maggiore è la concentrazione del complesso antigene-anticorpo, maggiore sarà l'affinità dei siti leganti dell'epitopo e del paratopo.
- Valenza → indica il numero di epitopi nell'antigene integro.
- Avidità → quando si considerano anticorpi con più regioni Fab (IgG, IgA, IgM), non si può più parlare di affinità, che riguarda l'interazione tra il singolo epitopo e il paratopo. In questo caso si parla di avidità, ovvero la forza con cui un anticorpo polivalente lega un antigene polivalente.

In condizioni fisiologiche, l'avidità aiuta a capire meglio il tipo di interazione antigene-anticorpo perché tiene conto di tutti i determinanti antigenici di un antigene e di tutti i paratopi di tutti gli anticorpi. L'avidità è definita da una costante che tiene conto dell'associazione e della dissociazione dei complessi antigene-anticorpo.

NB: In vivo le risposte nei confronti degli antigeni sono policlonali per cui la miscela di anticorpi che si ottiene da una risposta immunitaria è costituita da anticorpi che riconoscono diversi epitopi.

- Specificità → deriva dall'azione di una miscela di anticorpi (risposta policlonale) in grado di riconoscere epitopi differenti espressi sullo stesso antigene o antigeni diversi.
- Cross-reattività → una miscela di anticorpi può riconoscere un epitopo di una molecola diversa da quella verso la quale è stata generata quella risposta.
- Anticorpi monoclonali → attraverso questo metodo si poterono sintetizzare immunoglobuline in vitro a partire da una linea mutante di mieloma (tumore delle plasmacellule) di topo. Nella maggior parte delle cellule ci sono due vie di sintesi delle purine, una via per la sintesi ex novo (che necessita di tetraidrofolato) e una di salvataggio (che utilizza l'enzima HGPRT). Per le fusioni si usano cellule di mieloma prive di HGPRT, che normalmente sopravvivono usando la sintesi ex novo delle purine. In presenza di aminopterina (presente nel terreno HAT) non si forma tetraidrofolato, provocando un difetto nella sintesi ex novo delle purine. Questa linea di mieloma fu isolata perché può crescere indefinitamente ed incapace di crescere nel terreno di selezione HAT.

Dunque, per ottenere gli anticorpi monoclonali, si inietta l'antigene di interesse nel topo e lo si usa per immunizzarlo. In questo modo si ottengono linfociti B specifici per questo antigene. I linfociti B resi capaci di rispondere nei confronti dell'antigene di interesse possono essere fusi con le cellule del mieloma murino. Dalla fusione si ottengono ibridi che vengono selezionati in un terreno HAT: le cellule ibride contengono HGPRT derivante dagli splenociti e hanno la capacità di proliferare del mieloma.

Le cellule ibride producono anticorpi tutti uguali contro lo stesso antigene.

I primi anticorpi monoclonali prodotti erano di derivazione murina, ma non funzionavano se applicati come farmaci in quanto non erano in grado di attivare meccanismi effettori umani. Nel corso del tempo si sono messe in moto delle tecniche che hanno portato alla formazione di anticorpi chimerici, ovvero anticorpi umani con le regioni Fab murine. Col tempo si è visto che gli anticorpi chimerici, per via della presenza della porzione murina, davano effetti indesiderati. Quindi, si iniziò a parlare di anticorpi umanizzati che presentano solo le regioni CDR1, CDR2 e CDR3 murine. Ad oggi vengono anche prodotti anticorpi del tutto umani.

ELISA

- ELISA diretto → si cerca l'antigene, che è fissato su una superficie solida e l'anticorpo primario è coniugato ad un enzima che sviluppa una reazione colorimetrica. È un test semplice, ma ha un alto background dovuto al fatto che queste proteine possono agire in modo aspecifico. Per rimuovere questo background si mette una soluzione tampone contenente una proteina che non è correlata al sistema (BSA) per bloccare i siti liberi in cui potrebbero originarsi dei legami aspecifici.
- ELISA indiretto → si cerca un anticorpo, il quale lega l'antigene fissato su una superficie solida. Si utilizza poi un anticorpo secondario coniugato ad un enzima. Il vantaggio è una maggiore sensibilità dovuta ad un sistema a doppia specificità. Tra gli svantaggi c'è il fatto che si può avere background.
- ELISA sandwich → l'anticorpo di cattura è fissato e serve ad immobilizzare l'antigene sulla piastra. Si aggiunge un anticorpo primario (talvolta se ne aggiunge anche uno secondario) che

riconosce un epitopo diverso rispetto a quello riconosciuto dall'anticorpi di cattura.

Successivamente si aggiunge il substrato dell'enzima e si sviluppa una reazione colorimetrica che si può leggere con un lettore di piastre. Si ottiene un risultato quantitativo, la concentrazione dell'analita.

Si ricava una curva sigmoide. Per calcolare il risultato, però, bisogna porsi nella parte lineare della curva, dove vi è una relazione lineare tra la lettura della densità ottica e la concentrazione degli standard a concentrazione nota. Dunque, al fine di un risultato attendibile, si deve fare in modo che i campioni ricadano nella parte lineare della curva.

WESTERN BLOTTING

Il western blotting è una metodica qualitativa che permette di analizzare le proteine in una soluzione in base al loro peso molecolare.

- Determinazione della concentrazione proteica da caricare nel gel → bisogna lisare le cellule tramite un processo di centrifugazione e dosare le proteine tramite saggio di Bradford. Il saggio di Bradford si basa su una reazione colorimetrica: si fanno reagire il lisato cellulare ed il reagente di Bradford (contiene blu Comassie) che lega le proteine. La reazione colorimetrica sarà proporzionale al quantitativo di proteine presenti nel campione. La lettura avviene tramite uno spettrofotometro. Inoltre, si costruisce una retta con la (BSA), dove nelle ordinate c'è l'OD e nelle ascisse la concentrazione di BSA.
- Elettroforesi → le proteine vengono caricate su gel di poliacrilamide, dove migrano all'interno di un campo elettrico. Affinchè le proteine assumano carica negativa e migrino verso il polo positivo, vengono trattate con SDS. Questo le denatura e conferisce loro carica negativa. Il gel di poliacrilamide è costituito da due parti, stacking gel e running gel, e permette di ottenere delle bande nette. Il gel può avere concentrazioni differenti in base alla grandezza delle maglie che si vogliono ottenere.
- Trasferimento su membrana → si recupera il gel e si trasferiscono le proteine su una membrana di nitrocellulosa. Questo è possibile inserendo in una vaschetta una soluzione e un supporto su cui vengono impilati carta assorbente, gel, membrana, carta assorbente e un peso. Per capillarità la soluzione salirà e trascinerà le proteine sulla membrana.
- ELISA → si utilizza un anticorpo primario non coniugato che lega la proteina da studiare. In seguito, si aggiungono un anticorpo secondario coniugato e il reagente per sviluppare la reazione colorimetrica. Di tutte le proteine migrate nel gel, si ottengono delle bande solo in corrispondenza delle proteine di interesse.

LUMINEX/BIOPLEX

È una tecnica che permette l'analisi simultanea fino a 100 differenti biomolecole in uno stesso campione. Si basa sull'utilizzo di microsfele di polistirene coniugate a fluorocromi differenti. Ad ogni microsfera viene legato un anticorpo specifico per l'analita che si vuole quantificare. Successivamente, ad un differente epitopo si lega l'anticorpo secondario coniugato ad un altro fluorocromo

Lo strumento sfrutta lo stesso principio del citofluorimetro per rilevare reazioni che avvengono sulla superficie di microsfele fluorescenti. Le microsfele passano una alla volta da un capillare e vengono colpite da due laser: a questo punto si leggono le due fluorescenze. In particolare, il laser rosso identifica l'analita associato alla microsfera, mentre quello verde indica la quantificazione.

ANGIOEDEMA EREDITARIO

Si tratta di una malattia autosomica dominante ereditaria molto rara caratterizzata da episodi di edema sottocutaneo e sottomucoso. L'angioedema è legato al deficit della proteina C1-inibitore, che inibisce la via classica del complemento. Questa proteina appartiene alla famiglia delle serpine e inibisce le serino-proteasi. Viene chiamato substrato suicida perché crea un legame covalente irreversibile con il sito catalitico per cui deve essere sintetizzato ex novo.

Il C1-inibitore può intervenire in tantissimi punti nelle cascate dell'organismo: quando entrambi i geni funzionano la malattia non si manifesta perché la dose di enzima soddisfa l'impegno di controllo delle cascate biologiche, mentre quando è presente in bassa concentrazione (eterozigoti) sorge il problema.

Nella cascata da contatto delle chinine determina il mancato controllo della formazione di bradichinina. In questo meccanismo, la pre-callicreina si trasforma in callicreina, che attiva il chinogeno che porta alla formazione di bradichinina. Il mancato controllo di questo meccanismo porta ad una produzione eccessiva di bradichinina, che si lega a livello di BKR-2 e determina vasodilatazione e alterazione della permeabilità vascolare.

Ci sono delle pubblicazioni che affermano che alcune citochine regolano la sintesi di C1- inibitore. Uno studio è stato svolto all'ospedale Cervello. Nello specifico, durante lo studio sono stati seguiti 17 pazienti (11 maschi e 6 femmine) e 19 controlli sani per valutare i dosaggi di alcune citochine su campioni di siero. Sono stati messi a confronto i risultati ottenuti nei pazienti durante un attacco acuto e durante la remissione e nei controlli sani. È stato messo in evidenza che ci sono delle differenze significative tra lo stato basale e la crisi e che, quindi, c'è un movimento di citochine della sottopopolazione Th-17 importanti per l'infiammazione (IL-6, IL-17).

REAL TIME PCR

È una tecnica legata che si può usare a scopo diagnostico e che permette di monitorare la PCR in tempo reale per misurare la quantità di sequenze amplificate nel campione di interesse.

Si usa per la genotipizzazione, ovvero per valutare mediante sonde se ci sono varianti alleliche nel campione che si vuole studiare.

La real time fa uso della Taq polimerasi (che sia attività polimerasica che attività esonucleasica 5'-3') e di una sonda che sfrutta la FRET (al 5' c'è il reporter fluorescente che viene bloccato dalla vicinanza con il quencher al 3'; quando il quencher viene allontanato, avviene l'eccitazione del reporter che emette fluorescenza) capace di ibridarsi a una regione di DNA compresa in un amplicone più ampio delimitato da due primer.

Il sistema è costituito dal template, primer forward, primer reverse e sonda con reporter e quencher alle estremità.

Questo metodo viene usato per vedere se c'è una sostituzione a singolo nucleotide all'interno di una sequenza di DNA. Si sintetizzano due sonde, una con il nucleotide WT e una con il nucleotide mutato, in modo che sicuramente una delle due ibriderà (le due sonde hanno reporter diversi).

Quando si fa la q-PCR si va incontro a cicli di denaturazione, annealing e allungamento.

Durante la fase di allungamento, la Taq polimerasi, avendo attività esonucleasica, degrada la sonda provocando l'allontanamento del reporter dal quencher e la conseguente emissione di fluorescenza da parte del reporter. A seconda del fluorocromo liberato è possibile capire quale nucleotide è presente in quella regione di DNA.

NB: In caso di eterozigosi si leggeranno entrambe le sonde.

- SNPs (polimorfismi a singolo nucleotide) → in determinate posizioni del genoma un singolo nucleotide viene sostituito rispetto al WT. Affinché una sostituzione possa essere chiamata SNP deve avere una frequenza nella popolazione umana almeno dell'1%.