

PATOLOGIA

La Patologia nasce a metà '800 quando Rudolf Virchow dimostrò che le patologie derivano da un danno ad una cellula che può essere reversibile o meno.

Quando una cellula subisce un danno da un agente chimico o fisico di intensità medio-bassa cerca di superarlo o si adatta ad una nuova situazione. Questo tipo di danno è reversibile perché la cellula torna alla sua attività normale. Se invece il danno è forte o persistente (irreversibile), la cellula non riesce a superarlo e quindi solitamente muore per necrosi o autofagia. I tumori causano un danno irreversibile anche se la cellula non muore.

I fattori eziologici, che causano una malattia, possono essere:

- Fattori estrinseci: fisici (radiazioni, cambio di temperatura con ustioni o freddo persistente, urti o lesioni), chimici, infettivi e ipossia (o anossia = mancanza di ossigeno);
- Fattori intrinseci: nutrizionali, genetici, neoplastici, endocrini e immunologici;

RISPOSTA ALLO STRESS ACUTO

La cellula sotto stress aumenta di volume per ingresso di acqua e forma bolle liberate nei tessuti circostanti. Inoltre, la cromatina al suo interno si ammassa a causa della diminuzione del pH, i suoi mitocondri si rigonfiano (diventano sferici e gonfi), i ribosomi si disperdono smettendo la sintesi proteica e si ha una degenerazione vacuolare, ovvero la formazione di vacuoli.

Tutte queste conseguenze sono parte del rigonfiamento igroscopico che aumenta il volume della cellula del 200% in 3 minuti dovuto principalmente ad ipossia (scarsità o assenza di ossigeno) per soffocamento o avvelenamento da CO.

La risposta a questo mancanza di ATP modifica l'attività cellulare, soprattutto per quanto riguarda la pompa sodio-potassio: si accumula Na^+ intracellulare che richiama acqua per osmosi causando il rigonfiamento cellulare. Se persiste la carenza di ossigeno, la cellula va incontro a glicolisi anaerobia però questa porta alla produzione di acido lattico che fa calare il pH della cellula. La diminuzione del pH causa l'addensamento della cromatina e la denaturazione delle proteine citoplasmatiche. L'accumulo di Na^+ e di Ca^{2+} riduce la fosforilazione

ossidativa che riduce la produzione di ATP e fa sì che i ribosomi si stacchino dal RER bloccando la sintesi proteica. Inoltre, il Ca^{2+} viene modulato attivando una serie di enzimi citoplasmatici in grado di degradare le membrane cellulari e portare la cellula alla necrosi per frammentazione cellulare.

Ischemia: perdita di apporto di sangue arterioso, dato ad esempio da un trombo, o ostacolo al deflusso venoso in un tessuto. Alla cellula vengono a mancare sia l'ossigeno che i metaboliti per cui non è possibile che essa sopravviva nemmeno per respirazione anaeroba (come accade per l'ipossia).

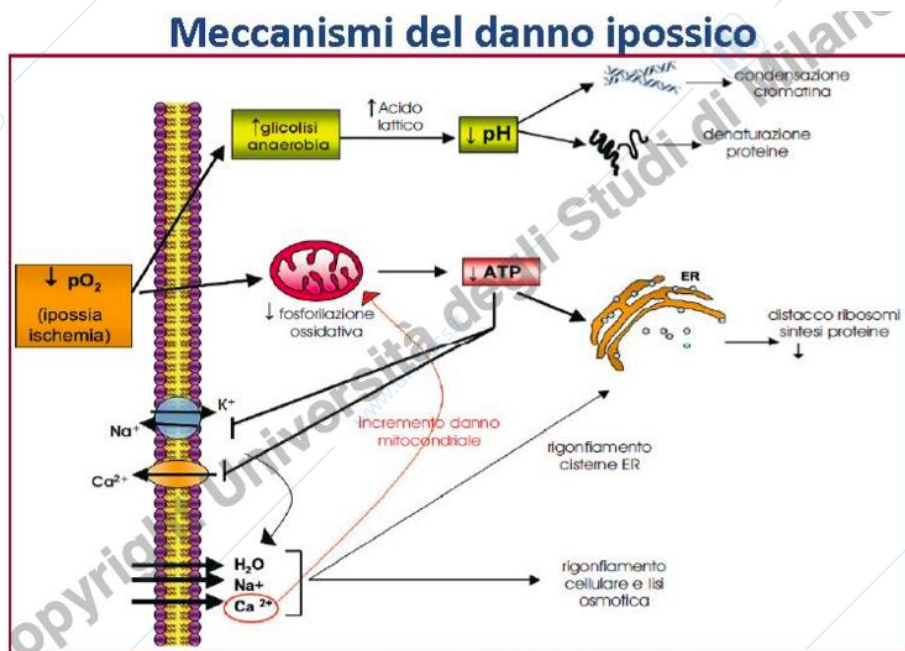
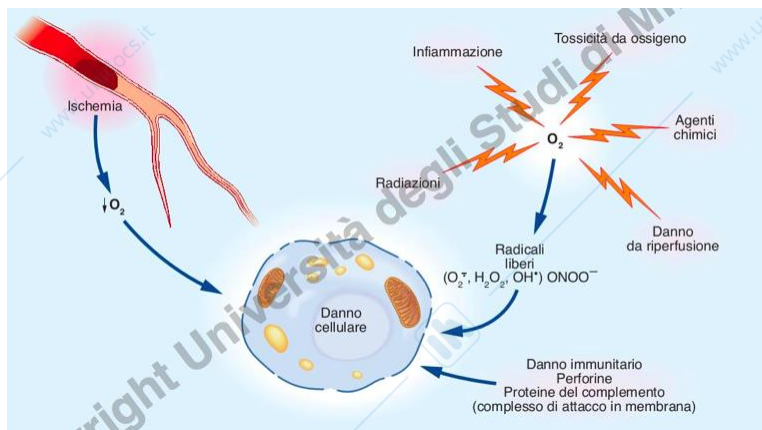


Figura 10.3. Danno da riduzione delle pressioni parziali di O_2 . ER, reticolo endoplasmatico.



Δ Quando si producono i radicali liberi dell'ossigeno (ROS), la cellula viene avvelenata. C'è un danno da riperfusione di un tessuto dopo una trombosi perché la cellula, anche riprendendo ossigeno, non avrà più le sue difese antiossidanti per tornare al suo normale funzionamento.

Un'altra reazione allo stress acuto è la produzione di Heat Shock

Proteins (HSP) che servono ad eliminare o ricondizionare altre proteine. Sono dette anche proteine **chaperon** perché guidano alla demolizione le proteine che non riescono a ripararle. La proteina danneggiata viene legata all'ubiquitina (attivata da HSP) che viene riconosciuta a livello del proteosoma, distrutta e denaturata a peptidi e AA per essere metabolizzate. Le ubiquitine vengono riciclate.

RISPOSTA ALLO STRESS CRONICO

Se la cellula non muore a seguito di un danno reversibile, avremo delle risposte adattative sulla lunga durata: l'autofagia, la modificazione del numero di cellule (aplasia, ipoplasia e iperplasia) e aumento delle dimensioni cellulari (atrofia, ipotrofia e ipertrofia).

“Autofagia” è un termine coniato nel 1963 da Christian DeDube (Premio Nobel per la medicina nel 1974 per la scoperta dei lisosomi). È un processo interno che attua una cellula per adattarsi e ridurre i propri bisogni metabolici cominciando un processo catabolico, ovvero di degradazione dei propri componenti cellulari (specialmente organelli e proteine) attraverso vacuoli di autocitosi.

Il vacuolo autofagico per degradare le sostanze al suo interno fa uso dei lisosomi che si fondono con l'autosoma formando un fago-autolisosoma, detto anche “vacuolo autofagico degradativo”. La cellula rimane viva ma riesce a compensare la perdita di elementi del suo citoplasma.

L'atrofia cellulare è una riduzione delle dimensioni della cellula dovuto al disuso della cellula (ad esempio, ciò accade nei muscoli non allenati) o se manca di nutrimento/stimolazione endocrina. L'involutione è invece la riduzione del numero delle cellule dovuta alla denervazione (causata da poliomelite, virus che colpisce i motoneuroni distruggendoli e creando una paralisi flaccida) o all'invecchiamento.

I fenomeni opposti, l'ipertrofia e l'iperplasia, sono dati dall'aumento della richiesta funzionale, una stimolazione maggiore di tipo nutritivo e metabolico. Possono anche verificarsi assieme. Le cause sono l'aumento di domanda metabolica e/o di lavoro, un eccessivo stimolo ormonale e un danno tissutale persistente (ad esempio, i calli).

Altre alterazioni cellulari sono:

- Displasia, ovvero cellule tra loro irregolari con crescita abnorme e non ben organizzata (è un evento che potrebbe evolvere a tumore);
- Metaplasia, ovvero la sostituzione di un tipo tessuto con uno più semplice. Un esempio è la metaplasia gastrica nelle persone che soffrono di ulcere in cui il tessuto intestinale viene sostituito con il tessuto duodenale. Nei fumatori invece abbiamo la metaplasia squamosa poiché l'orletto a spazzola dei bronchi è sostituito con un semplice tessuto squamoso.

2\03\2016

Patologie legate all'accumulo cellulare

Le patologie da accumulo sono date dai metaboliti che vengono accumulati negli spazi intracellulari o extracellulari, derivanti per lo più da sintesi interna ma anche dall'assunzione

esterna per esposizione massiccia ed importante (Amianto, silice ecc.). L'accumulo intracellulare può essere:

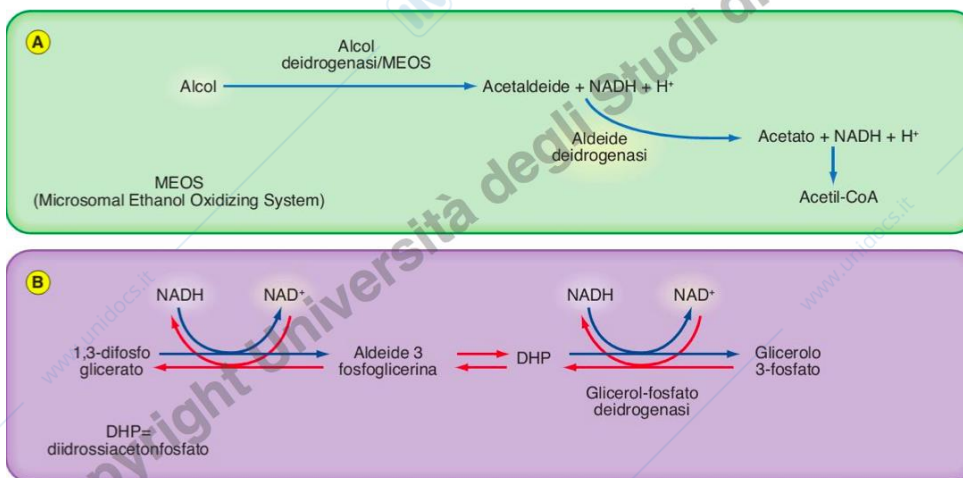
- Steatosi, accumulo di lipidi dovuto all'eccessiva introduzione di lipidi con la dieta, un'aumentata sintesi o una diminuita degradazione di questi prodotti. Il danno è dato o da un'eccessiva sintesi o una minore distruzione.
- Glicogenosi, carenza enzimatica che provoca l'accumulo di glicogeno.
- Accumulo di proteine con alterata conformazione dovuto al mal funzionamento dei lisosomi, organelli che contribuiscono alla digestione e degradazione di parecchie sostanze.
- Accumulo di materiale inorganico (Carbone contenuto nelle sigarette, silice e amianto che causano molto spesso mesotelioma=tumore ai polmoni) per eccessiva esposizione che la cellula non è in grado di digerire.

La steatosi, detta "degenerazione grassa", è un accumulo reversibile di trigliceridi all'interno delle cellule epatiche che colpisce fegato, reni e miocardio. Facendo la sezione del fegato si vedono questi lipidi con dei grossi vacuoli bianchi nel citoplasma, la struttura non è compatta come al solito.

La steatosi deriva dall'aumentato ingresso di acidi grassi negli epatociti a seguito di metabolismo alterato come nell'obesità o nel diabete. Può derivare anche dall'aumentata sintesi endogena di trigliceridi a seguito di intossicazione da alcol, questa è la causa più comune di steatosi.

Il metabolismo dell'alcol nel fegato causa un aumento di trigliceridi perché normalmente viene metabolizzato ad acetaldeide e NADH che si convertono in acetilcoenzima A. Il NADH rilascia H^+ con la formazione di glicerolo 3-fosfato, se noi abbiamo tanto NADH la reazione procede verso il glicerolo che si esterifica formando i trigliceridi.

Steatosi da abuso di alcool



L'abuso di alcool porta all'aumento dei precursori dei trigliceridi, quindi di trigliceridi stessi. L'acetaldeide prodotta è tossica per il fegato stesso, impediscono al fegato di svolgere le sue funzioni: ciò porta alla diminuzione dell'ossidazione degli acidi grassi che quindi si accumulano portando nel complesso alla

steatosi.

La glicogenosi è una malattia da accumulo che ha base genetica e si manifesta in forme diverse (ne esistono almeno otto diverse). L'individuo accumula glicogeno che non viene riutilizzato adeguatamente e rimesso in circolo nel sangue perciò si ha ipoglicemia. Gli individui che soffrono di questa patologia mangiano spesso per non perdere glicemia e soffrono di epatomegalia (fegato ingrossato per l'accumulo di glicogeno). Nelle cellule mancano gli enzimi degradanti, ovvero quelli che degradano il glicogeno. I problemi possono manifestarsi in tubuli renali e epatociti.

L'emosiderosi e l'emocromatosi sono forme di accumulo di ferro, uno sotto forma di emosiderina (aggregati di ferritina, proteina che accumula ferro e lo rende disponibile ai precursori degli eritrociti per produrre l'eme, sintetizzato in parte nel mitocondrio e in parte nel

citoplasma) e l'altro sotto forma di ferro libero. Quest'ultimo è un problema per chi ha l'anemia emolitica (patologia in cui si lisano troppi globuli rossi, hanno vita media più corta) perché questi pazienti devono metabolizzare tanto eme che satura le ferritine e le transferrine per cui si ha un accumulo di ferro libero generando stress ossidativo nelle cellule e in parecchi tessuti. Antracosi (accumulo di amianto), l'accumulo di carbone e silicosi sono altre forme di accumulo ferrico intracellulare.

La malattia associata all'accumulo extracellulare più comune è l'amiloidosi, scoperta da Virchow nel 1854 che chiamò la sostanza amiloide perché si colora in blu (come accade all'amido) con il colorante di Lugol. L'amiloidosi è un deposito di proteine extracellulari che formano proteine fibrillari insolubili che possono essere generalizzati o localizzati in un solo organo.

I precursori proteici con struttura alfa elica sono degradati solo parzialmente formando dei frammenti che si strutturano in β -fibrille, aggregano, precipitano e formano placche di amiloide. La struttura secondaria a foglietto β -piegheggiato forma fibrille di circa 7-10nm che resistono ai processi proteolitici e hanno una struttura quasi cristallina perché sono birifrangenti sotto luce polarizzata (alla luce polarizzata sono rifrangenti).

Per il 90% sono fibrille indigeribili derivanti da proteine a peso molecolare più elevato non del tutto degradate, associate ci sono delle proteine del siero, dette proteine di fase acuta (ad esempio la SAP è parte della famiglia delle pentaxine, molecole pentameriche), che sono sintetizzate dal fegato in risposta ad un processo infiammatorio acuto. In alcune patologie, in presenza di infiammazione si generano oltre all'amiloide anche queste proteine di fase acuta insolubili che precipitano con le fibrille di amiloide non degradata.

TIPI DI AMILOIDOSI SISTEMICA

Precursore	Proteina	Sistemica/ Localizzata	Sindrome
apoSAA 18000 Da	AA 8000 Da	sistemica	Infiammazione cronica (TB, lebbra, RA)
apoSAA	AA	sistemica	Febbre mediterranea (ereditaria)
Ig λ , Igk	AL	sistemica	Mieloma multiplo o gammopatie monoclonali
β 2- microglobulina	A β 2M	sistemica	Associata a dialisi

Nel caso di infiammazioni croniche come l'artrite reumatoide, la lebbra e la tubercolosi si accumula una proteina di fase acuta, chiamata SAA (=siero amiloide A, 18mila PM) il cui frammento che non è più digeribile, si deposita in modo sistemico in alcuni distretti e si accumula. La proteina SAA fa parte di proteine tipiche della risposta infiammatoria che sono prodotte dal fegato in grossa quantità, perciò si ritrovano nelle patologie che creano un'infiammazione cronica.

La stessa si accumula nella febbre mediterranea (malattia ereditaria), mentre un'altra forma è la proteina L (=catena Leggera degli anticorpi) che non viene digerita del tutto formando un frammento. Ciò accade nel mieloma multiplo, patologia tumorale che coinvolge i linfociti B che producono anticorpi in eccesso (nella fase tumorale) che non vengono digeriti, la catena leggera si accumula e forma delle lesioni. Lo stesso tipo di accumulo ce l'anno le persone sotto dialisi.

La forma di amiloide più conosciuta è l'amiloide che si accumula a livello cerebrale, in particolare le placche senili presenti nei pazienti con il Morbo di Alzheimer. La proteina che si deposita nell'amiloide associata a questa patologia deriva da una proteina codificata dal cromosoma 21, chiamata precursore della proteina APP, che forma un frammento che va a formare le fibrille, si aggrega e poi forma le placche. Si deposita nei vasi cerebrali e nel cervello in generale. Lo stesso frammento proteico si presenta

TIPI DI AMILOIDOSI LOCALIZZATA

Precursore	Proteina	Localizzata	Sindrome
APP precursore β -proteina 110- to 135-kDa Chr 21	A β AB40- AB42 kDa	Placche senili, cervello Vasi cerebrali	Morbo di Alzheimer
APP	A β	localizzata	Sindrome di Down
APP	A β	localizzata	Invecchiamento cerebrale
proteina prionica PrP ^{Sc} 200 AA, Chr 20	APrP ^{Sc}	Localizzata SNC	Malattie neurodegenerative spongiformi

anche nell'invecchiamento fisiologico e nei pazienti che presentano la sindrome di Down (trisomia 21). Anche la proteina prionica (responsabile del morbo della mucca pazza, malattia neurodegenerativa di tipo spongiforme) deriva da un precursore di 200 AA che non viene degradato completamente e quindi si accumula.

Nel morbo di Alzheimer si perdono tutte le funzioni superiori del cervello, rimane solo il bulbo con le funzioni primordiali che permettono il corretto funzionamento di cuore e polmoni, la malattia è neurodegenerativa che porta ad un riassorbimento e distruzione della corteccia e un allargamento dei ventricoli. Nel morbo di Alzheimer, oltre alle placche che alterano gli assoni nervosi delle zone dove si depositano, si trova un'altra lesione dovuta a dei grovigli neurofibrillari di proteina TAU iperfosforilata che destabilizza i microtubuli delle cellule nervose danneggiandone le funzioni.

MORTE CELLULARE

Agenti fisici e chimici, microorganismi e ipossia portano alla morte, se lo stimolo è troppo intenso o se la cellula non è in grado di adattarsi.

La morte cellulare può avvenire per necrosi (morte traumatica che può generare un danno ai tessuti circostanti, c'è infiammazione) o per apoptosi (morte fisiologica attuata dagli organismi durante la crescita che se è indotta non causa danno all'organismo).

La necrosi parte dallo stimolo dannoso di una cellula, c'è una carenza energetica e quindi un rigonfiamento idropico. La cellula mette in atto sistemi di difesa e, se lo stress cessa, può recuperare le sue funzioni iniziali. Se invece lo stress persiste, la carenza energetica crea una disgregazione degli organelli, la membrana diventa sempre più lassa formando un blobbing (=vescicole) e si lisa lasciando nell'ambiente circostante tutti gli organelli citoplasmatici. Ciò causa l'infiammazione come risposta ad un materiale esogeno riconosciuto come dannoso e quindi da eliminare.

La necrosi è un danno cellulare irreversibile che inizia con una disfunzione energetica, alterazione della permeabilità della membrana, aumento di Ca^{2+} intracellulare, accumulo di lipidi, attivazione di proteasi che digeriscono le membrane, rottura della cellula e rilascio di organelli e citoplasma. Solitamente questa necrosi riguarda la parte di un tessuto, non una singola cellula.

Si possono distinguere diversi tipi di necrosi su base istologica, ovvero guardando come muta il tessuto.

- 1) Guardando come varia la permeabilità al Ca^{2+} , calcio ha una concentrazione extracellulare di 1mM, mentre nella cellula deve essere meno di 0,1 micromM. L'aumento di calcio nel citoplasma attiva enzimi citoplasmatici che distruggono la cellula.
- 2) Gli stimoli ossidativi, come l'acqua ossigenata produce radicali liberi, genera un danno del DNA o aver origine dai mitocondri e quindi

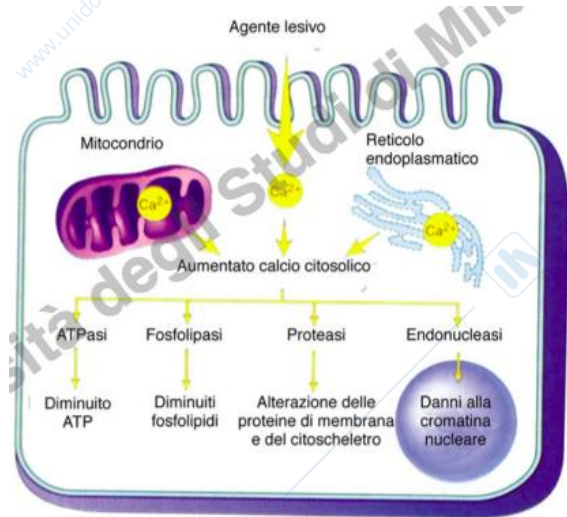
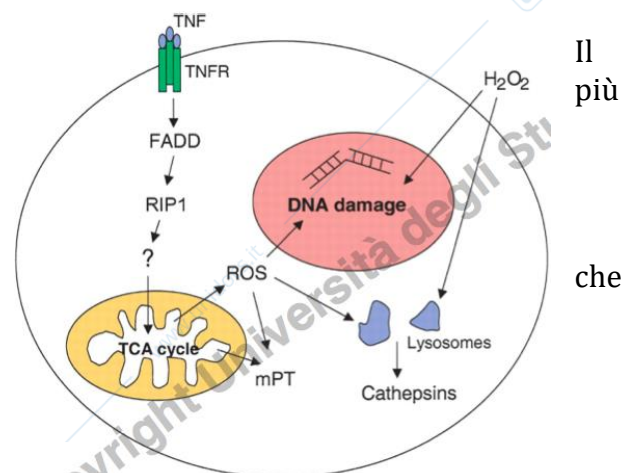


FIGURA 1-3. Fonti e conseguenze di aumentati livelli di calcio citosolico.



Il più che

causare un aumento di permeabilità che porta distruzione delle membrane.

- 3) Il TNF(tumor necrosis factor) fu scoperto come un fattore prodotto dai macrofagi circolanti, sotto opportuna stimolazione, che in presenza di altre cellule(un recettore specifico) può indurre necrosi o apoptosi a seconda del recettore.

Ci sono alterazioni morfologiche che ci fanno capire che il tessuto è andato in necrosi, un esempio è la **necrosi coagulativa** in cui la cellula appare quasi normale ma il citoplasma è tutto omogeneo e i nuclei non ci sono più. Si trova prevalentemente nell'ischemia.

Un'altra forma di necrosi è la **necrosi colliquativa** tipica di foruncoli e ascessi che consiste nell'autodigestione e dissoluzione cellulare da parte di enzimi proteolitici. Può avvenire anche a seguito di ascessi di tipo batterico che portano ad ascessi gengivali o ad appendicite acuta. Le cicatrici sono dovute alla riparazione da parte del collagene, rendono priva di funzionale la zona necrotica.

La **necrosi liquefattiva** può verificarsi in un foruncolo o a seguito di un ictus(occlusione di un'arteria cerebrale che può causare morte istantanea) distruggendo porzioni più o meno ampie del cervello che portano a una paralisi parziale o anche ad afonia.

La **necrosi gangrenosa** è dovuta ad un tessuto che va in necrosi perché la zona non è più irrorata. Colpisce soprattutto le estremità del nostro organismo in cui c'è un problema vascolare di arterio

sclerosi(accade ai soggetti diabetici, specialmente ai piedi) dovuta all'iperglicemia.

Il tessuto necrotico non riceve sufficiente nutrimento, diventa incapace di guarire lesioni e crea un'inflammatione che scatena l'azione di batteri infettivi.

Altre alterazioni morfologiche del tessuto necrotico sono:

la **necrosi di tessuto adiposo**, tipica del tessuto ricco di lipidi come quello

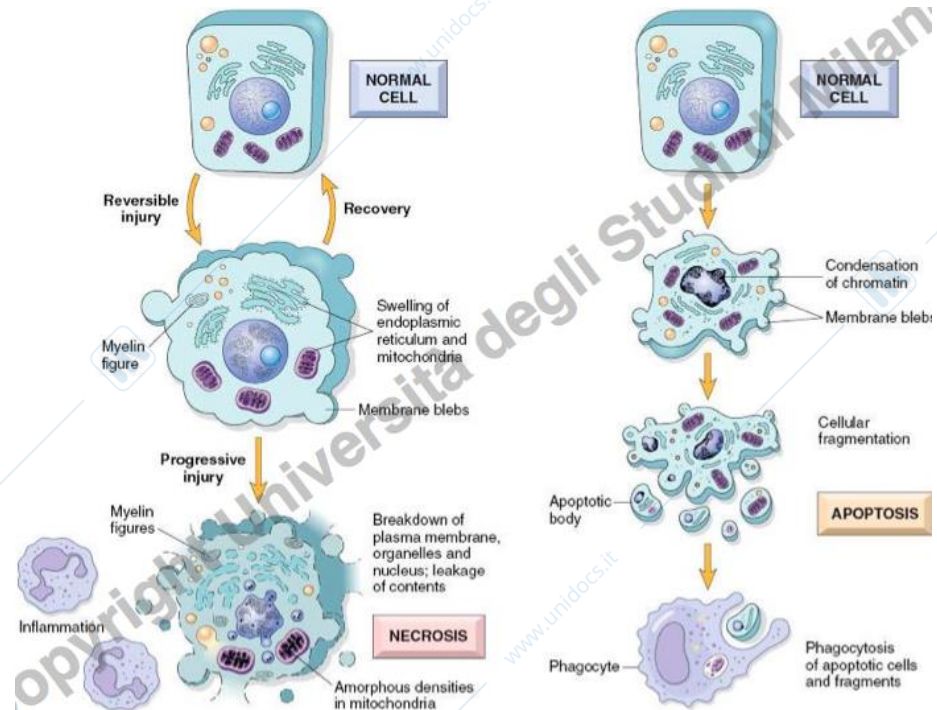
pancreatico(pancreatiti) e delle situazioni di traumi;

la **necrosi fibrinoide**, associata alla presenza di materiale eosinofilo(=che si colora di rosso come la fibrina, derivata dalla coagulazione) che si trova soprattutto nelle vasculiti,

inflammatione che riguardano i vasi; e la **necrosi caseosa** che è tipica dei granulomi della tubercolosi e della lebbra. La necrosi caseosa è tipica della tubercolosi in cui nei polmoni si formano dei tubercoli di micobatteri fagocitati da macrofagi che non li sanno digerire. Questi richiamano altri macrofagi formando cellule giganti e multinucleate che provocano un richiamo continuo e formano una zona di necrosi centrale che non è ben irrorata, perciò assume un colore biancastro.

APOPTOSI

L'apoptosi è una frammentazione della cellula, non si disgrega ma si formano corpi apoptotici che vengono fagocitati, immagazzinati e digeriti dai macrofagi. Questa è una morte cellulare programmata e un'eliminazione fisiologica di cellule durante l'embriogenesi e la morfogenesi.



Controlla le risposte immunologiche e la crescita cellulare, il nucleo si addensa, la cromatina viene frammentata e il citoplasma si suddivide in vescicole. Non provoca infiammazione perché non viene rilasciato nulla nell'ambiente, è una conseguenza positiva per l'organismo.

Il processo apoptotico non riguarda necessariamente un tessuto, accade ad una sola cellula che si stacca dalle cellule a fianco, si addensa, si attivano a cascata gli enzimi apoptotici e formano i corpi apoptotici che vengono fagocitati.

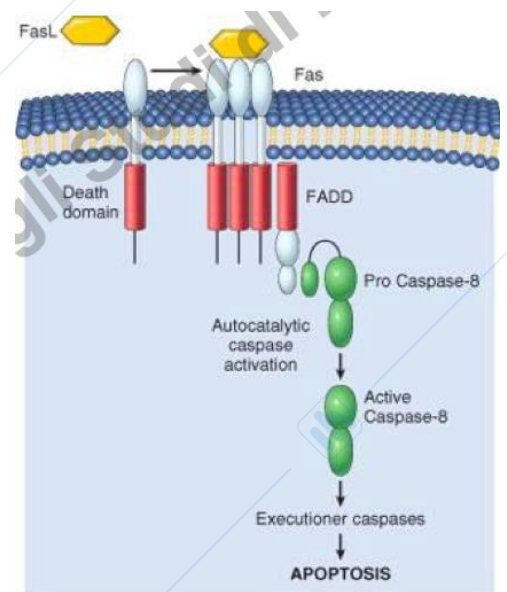
Gli enzimi coinvolti nell'apoptosi sono delle proteasi che si attivano in sequenza, dette **casпси**. L'apoptosi richiede un dispendio di energia, tant'è che la membrana rimane intatta, anche quella dei corpi apoptotici. Ci sono degli induttori molto specifici, come il TNF, e geni specifici come quelli apoptotici.

Ci sono tre fasi nel processo apoptotico:

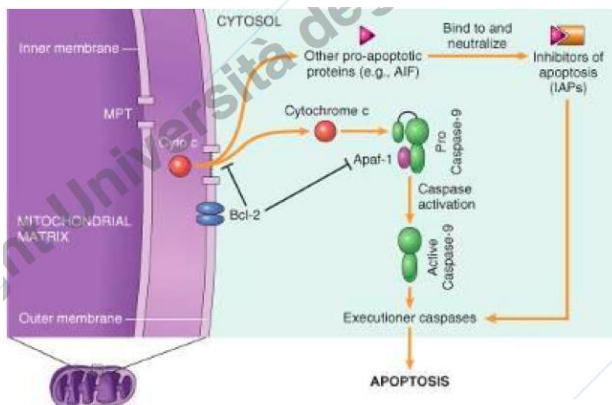
- Fase di induzione dell'apoptosi, cioè il segnale che indica alla cellula di andare in apoptosi;
- Fase effettrice, ovvero si mettono in moto enzimi e casпси che attivano i mitocondri (cambiano la loro permeabilità);
- Fase di degradazione della cromatina, con attivazione delle endonucleasi e formazione dei corpi apoptotici.

Via estrinseca:

La cellula riceve dall'esterno dei segnali dai fattori esogeni come TNF (che lega il recettore di tipo 1) o FAS che lega il recettore che ha un dominio di morte, che si trova anche nel recettore del TNF, detto FADD (Death Domain) che trasmette dei segnali citoplasmatici (le fosforilazioni) che attivano la procaspasi 8, un enzima proteolitico, che a sua volta agisce da proteasi per altre proteine della stessa famiglia, abbiamo una attivazione enzimatica proteolitica a cascata. Questo tipo di attivazione si trova anche nelle coagulazioni e in altri processi di difesa.



Via intrinseca:



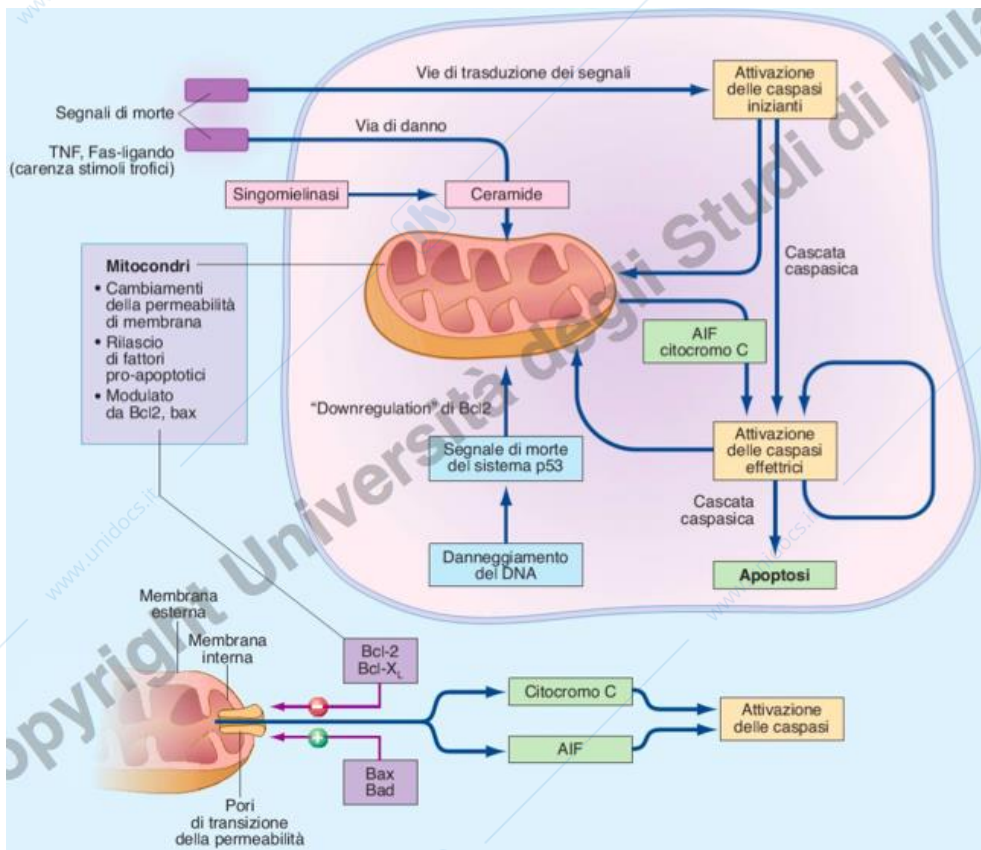
Avviene a partire dal mitocondrio danneggiato che aumenta la permeabilità formando un megacanal che permette la fuoriuscita di materiale dai mitocondri come il Citocromo C che attiva le caspasi, la procaspasi 9, e la cascata prosegue fino ad attivare enzimi che arrivano al nucleo.

Il processo apoptotico è sotto controllo di altre proteine come BCL2 (oncogene = gene che se alterato provoca un tumore) e p53

Fase mitocondriale: Caduta del potenziale della membrana dei mitocondri, si apre il megacanal, fuoriesce Citocromo C che induce l'apoptosi. Abbiamo proteine che sono in grado di regolare negativamente come BCL2 e BCL-X, mentre Bax e Bad lo stimolano ad aprirsi. Le caspasi sono delle cisteine (=C) aspartico (=A, perché riconoscono acido aspartico nel sito di taglio dell'enzima) proteasi (=ASI, perché è un enzima). Alcune caspasi sono **iniziatrici** (casp2, 8, 9 e 10) perché stanno all'inizio della cascata enzimatica, mentre le caspasi più a valle sono dette **effettrici** (casp1, 3, 6 e 7). Ciascuna

Uno dei sistemi con cui è stata individuata l'apoptosi è stato marcare il DNA. Facendo scorrere su un gel di agarosio il DNA di una cellula viva si forma una banda ad alto peso molecolare in alto, mentre il DNA di cellule in apoptosi forma delle bande ben definite di 400-500 paia di basi che si differenziano dalla cellula in necrosi perché queste ci danno una strisciata uniforme.

caspari taglia in maniera proteolitica un substrato formando un frammento attivo che agisce sulla caspari successiva e così via.



Fase di endonucleasi:
 Si attivano le endonucleasi che vanno a frammentare la cromatina. Il nucleo delle cellule in apoptosi ci appare così ben definito perché le endonucleasi che si attivano nell'apoptosi fanno dei tagli ben precisi, ad esempio la Cad(=Deossiribonucleasi Caspasi Dipendente) fa tagli di 180 paia di basi. L'AIF(=Apoptosis Inducing Factor) dopo essere uscito dai mitocondri,

arriva al nucleo e determina la condensazione della cromatina. L'Endo-G è un'endonucleasi che determina i tagli sul DNA a singolo filamento.

Sulla superficie del corpo apoptotico compaiono dei segnali di 'eat me' di fosfatidilserina (parte dei fosfolipidi di membrana) che, anziché essere all'interno della membrana, viene esposta all'esterno e riconosciuto dai macrofagi. Questo stesso segnale viene esposto dai globuli rossi senescenti.

È un fenomeno di flip-flop perché la fosfatidilserina normalmente si trova nel foglietto interno del doppio strato lipidico della membrana cellulare, ma nel processo apoptotico passa dall'interno all'esterno e lega l'annexina (proteina presente sulla superficie del macrofago) che viene riconosciuta dal macrofago che ha un recettore specifico.

Il macrofago una volta che ha fagocitato il corpo apoptotico, si attiva producendo citochine TGF- β (= *Transforming Growth Factor*) e IL10 (= *Inter Leuchina*) che sono inibitorie, ovvero manda segnali che bloccano qualsiasi tipo di reazione di difesa.

Abbiamo dei coloranti (come il tripan blu) che se la membrana è intatta rimangono all'esterno, nei corpi apoptotici escludono il colorante per un certo periodo di tempo mentre per la cellula morta entra all'interno.

Nel corpo apoptotico il tripan blu non entra, ciò indica che la membrana è ancora intatta.

NECROSI VS. APOPTOSI

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Grave perdita energetica | <input type="checkbox"/> Energia –dipendente |
| <input type="checkbox"/> Lisi delle membrane citoplasmatiche | <input type="checkbox"/> Membrane intatte |
| <input type="checkbox"/> Interesse più cellule o un tessuto | <input type="checkbox"/> Interesse solo 1 o poche cellule |
| <input type="checkbox"/> Edema cellulare -degradazione DNA | <input type="checkbox"/> Citoplasma condensato, cromatina frammentata |
| <input type="checkbox"/> Entrano i coloranti vitali | <input type="checkbox"/> Esclusi i coloranti vitali |
| <input type="checkbox"/> Organelli dilatati | <input type="checkbox"/> Organelli intatti |
| <input type="checkbox"/> Rigonfiamento dei mitocondri | <input type="checkbox"/> Maggiore permeabilità dei mitocondri |
| <input type="checkbox"/> Genera infiammazione e riparo cellulare | <input type="checkbox"/> Corpi apoptotici: esposta PS |
| | <input type="checkbox"/> No infiammazione, inibizione |

Le patologie neurodegenerative hanno un'aumentata apoptosi, così come ci sono nel danno da ri-perfusione e in molti tumori o sindromi mielodisplastiche (ovvero quelle coinvolgono i precursori midollari e possono portare ad anemia o ad alte immunodeficienze). Anche nell'AIDS il virus che infetta i linfociti T-helper ne induce la perdita funzionale e fisica facendo perdere la difesa immunitaria all'organismo.

Quasi tutti i tumori invece hanno una diminuita apoptosi. La p53 è una proteina mutata nel 93% dei tumori umani che in condizioni normali crea apoptosi se vede che il DNA è alterato.

LE DIFESE DELL'ORGANISMO

Le difese dell'organismo contro agenti esterni e patogeni sono l'immunità innata e l'immunità adottiva. La specie umana è stata difesa da questi sistemi, l'immunità innata è tipica di tutti gli organismi mentre l'immunità adottiva deriva dalla spinta evolutiva.

Questa risposta non sarebbe sufficiente se

ci fosse una componente anatomica e fisica data dalle barriere come la cute (epidermide) e le mucose, come quella respiratoria e quella gastrointestinale. Anche l'occhio ha una risposta difensiva data dalle lacrime.

Queste barriere fisiche per essere efficaci devono essere integre.

A livello cellulare si attivano i lisozima, mentre a livello delle mucose ci sono difese come la clearance mucociliare. Il muco nei bronchi intrappola i batteri grazie al movimento delle ciglia, poi viene spinto verso la faringe ed espulso verso lo stomaco che ha un pH tale da uccidere tutti i batteri. Il vomito e la diarrea sono altre barriere usate per espellere le sostanze tossiche. Il processo infiammatorio è un meccanismo che si instaura a difesa dell'organismo quando c'è un evento lesivo e coinvolge sia l'immunità innata che quella adottiva. E' alla base di molte manifestazioni patologiche.

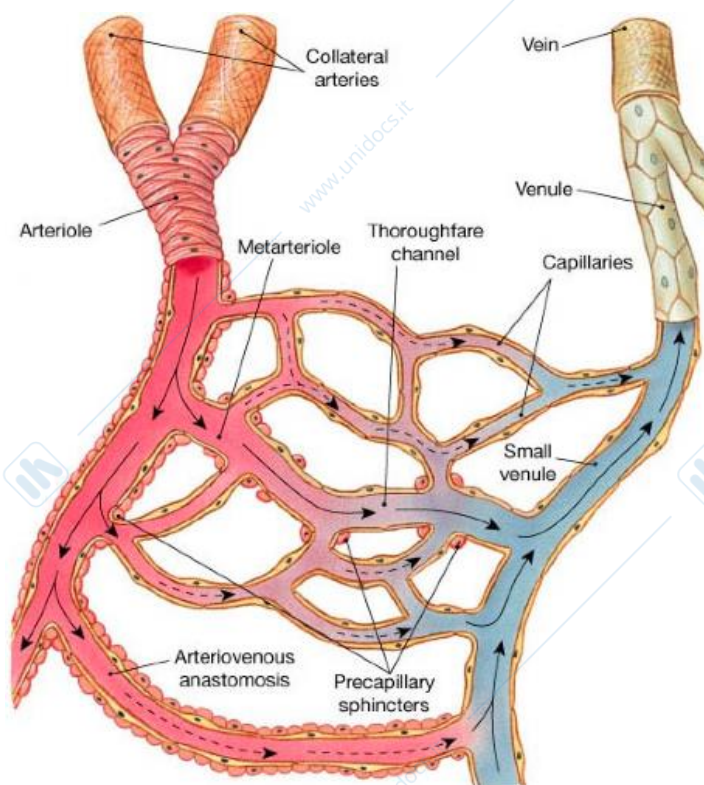
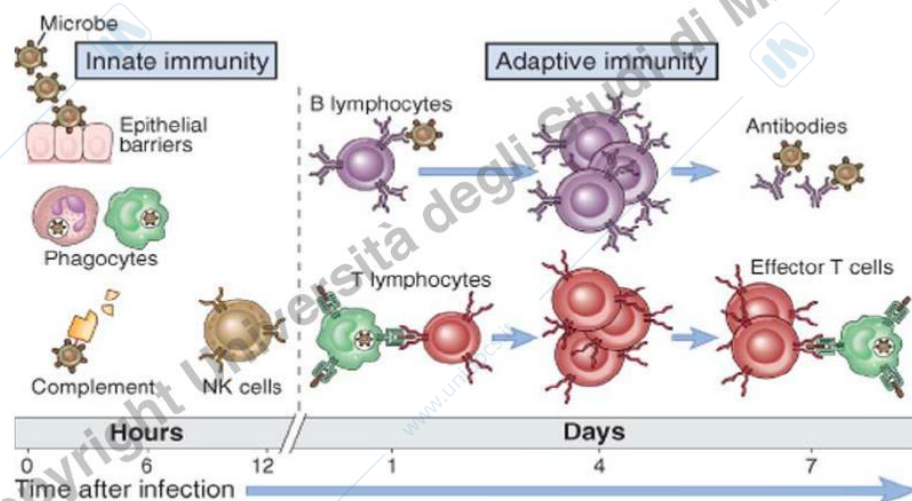
La risposta innata è una risposta molto veloce che agisce entro le 6-12 ore perché sono già predisposte a rispondere all'infezione, l'immunità adattativa si attiva quando il danno è persistente.

L'INFIAMMAZIONE

L'infiammazione è una reazione tissutale a un agente lesivo, l'andamento dell'infiammazione può essere acuto o cronico. E' una reazione della microcircolazione che è caratterizzata da movimento di fluidi e leucociti dal sangue ai tessuti extravascolari con lo scopo di circoscrivere e riparare i danni fisici. Lo scopo è fondamentalmente la difesa. Se l'agente patogeno persiste o il sistema non è in grado di rispondere adeguatamente, l'organismo può avere dei sintomi derivanti dalla difesa stessa.

CARATTERISTICHE DELL'IMMUNITA' INNATA E DELL'IMMUNITA' ACQUISITA : cinetica

non



I segni clinici che permettono di caratterizzare l'infiammazione sono l'arrossamento, il calore, il gonfiore, il dolore e la perdita di funzione.

Il microcircolo è la terminazione della circolazione arteriosa e l'inizio di quella venosa, caratterizzata dalle arteriole. I vasi sono rivestiti di endotelio che è monostrato e poggia su una membrana basale di tessuto connettivo, in particolare di collagene di tipo IV (per essere idrolizzato si usa la collagenasi IV). All'esterno troviamo uno strato di cellule muscolari lisce che permettono ai vasi di dilatarsi o contrarsi. I capillari hanno invece una parete ancora più semplice fatta da endotelio e membrana basale, la contrazione è determinata da uno sfintere (anello di muscolatura liscia) che lo rende aperto o chiuso. In condizioni normali sono pochi i capillari aperti, si usano solitamente i canali preferenziali. Si aprono quando c'è un'infiammazione.

Lo stroma, ovvero lo spazio interstiziale, è formato da tessuto di peptidoglicani, connettivo e matrice extracellulare. Qui si trovano le terminazioni nervose con macrofagi come i mastociti, caratterizzata dall'aver all'interno granuli contenenti istamina (mediatore che si libera in condizioni di allergia, ma anche quando il microcircolo viene danneggiato o stimolato).

Fase Vascolare

Il *primo evento vascolare* è la vasodilatazione per iperemia, in cui il vaso si dilata e viene rilasciato più sangue nella zona infiammata. Il mediatore del processo è il monossido di azoto (NO) che viene prodotto dalle cellule una volta che queste hanno legato, con il recettore H1, l'istamina proveniente dai mastociti.

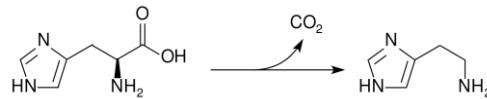
NO porta all'aumento di GMP nelle cellule muscolari che quindi si rilasciano.

I mastociti tessutali e gli eosinofili circolanti sono delle cellule di origine midollare addette alla reazione immediata perché la esocitosi dei granuli libera NO. L'istamina viene sintetizzata all'interno dei mastociti eosinofili e deriva da un aminoacido decarbossilato, l'istidina, che viene metabolizzato all'interno del fegato ed eliminato attraverso le urine.

L'istamina può interagire con tre diversi sottotipi di recettori (H1, H2, H3) che sono distribuiti in diversi

distretti. Il primo (H1) si trova nella muscolatura liscia ma anche a livello endoteliale, una volta legata l'istamina si ha una trasmissione di segnali attraverso l'IP3 (= Inositolo 3-Fosfato) e il diacilglicerolo che causano la produzione di ossido di azoto. L'NO è una molecola scoperta nel 1993, sintetizzata dall'arginina e ossigeno per dare NO e citrullina. La reazione enzimatica è mediata dalla NOSintetasi, richiede NADPH, una serie di cofattori (FAD, flavine, FMN e la tetraidropiropterina) e la camodulina calcio-dipendente.

Le **NOSintetasi** agiscono a livello neuronale (dove agisce da mediatore chimico), nel sistema immune e cardiovascolare come la NOSinducibile (si attiva nei momenti di stress cellulare dove media la vasodilatazione) e nell'endotelio come NOScostitutiva che regola il tono vasale. Anche i batteri possono avere la loro NO-sintasi, in molto Gram-, che gli serve per difendersi dallo stress ossidativo.

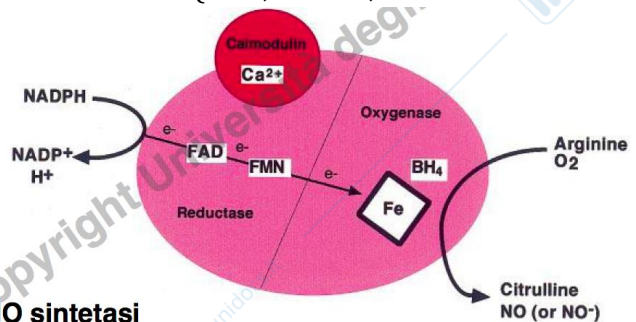


Recettori per istamina

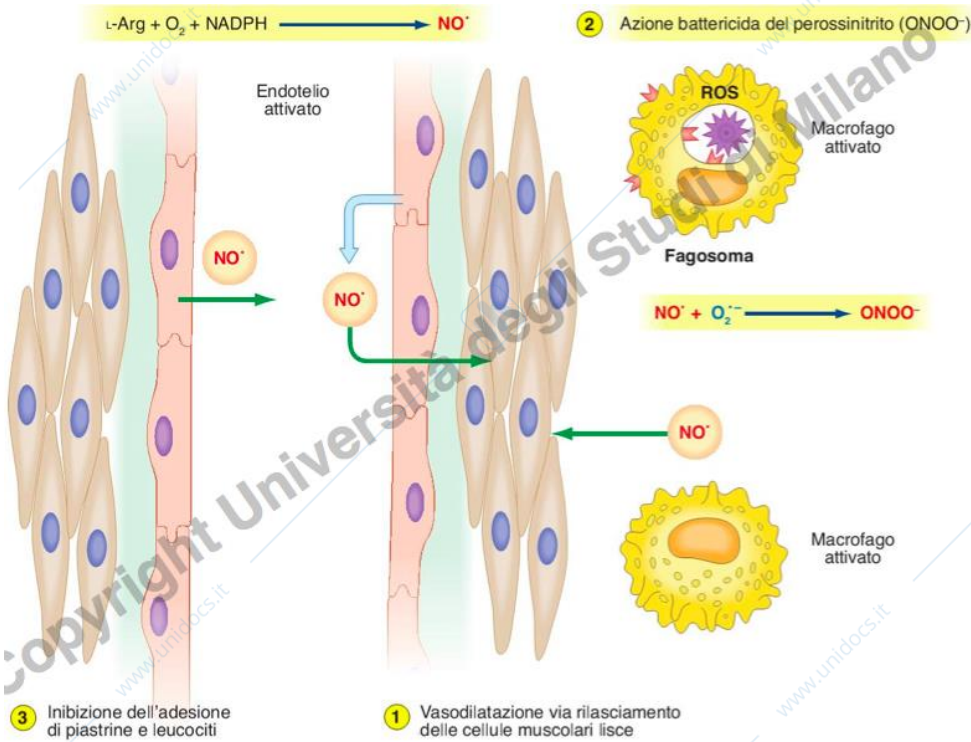
Histamine receptor subtypes.

Receptor Subtype	Distribution	Postreceptor Mechanism	Partially Selective Agonists	Partially Selective Antagonists
H ₁	Smooth muscle, endothelium, brain	↑ IP ₃ , DAG	2-(<i>m</i> -Fluorophenyl)-histamine ¹	Mepyramine, triprolidine
H ₂	Gastric mucosa, cardiac muscle, mast cells, brain	↑ cAMP	Dimaprit, impromidine, amthamine	Ranitidine, tiotidine
H ₃	Presynaptic: brain, myenteric plexus, other neurons	G protein-coupled	R- α -Methylhistamine, imetit, imnepip	Thioperamide, iodophenpropit, clobenpropit

¹Partial agonist.



NO sintetasi



Gli enzimi che vengono attivati nel caso dell'infiammazione sono la NOS endoteliale e la NOS inducibile (presente anche nei macrofagi) che portano alla vasodilatazione con iperemia dovuta alla produzione di NO da parte delle cellule endoteliali sotto stimolazione di istamina.

Nelle cellule esiste anche l'arginasi (enzima che metabolizza l'arginina), per agire sul meccanismo noi possiamo agire sul substrato, ovvero

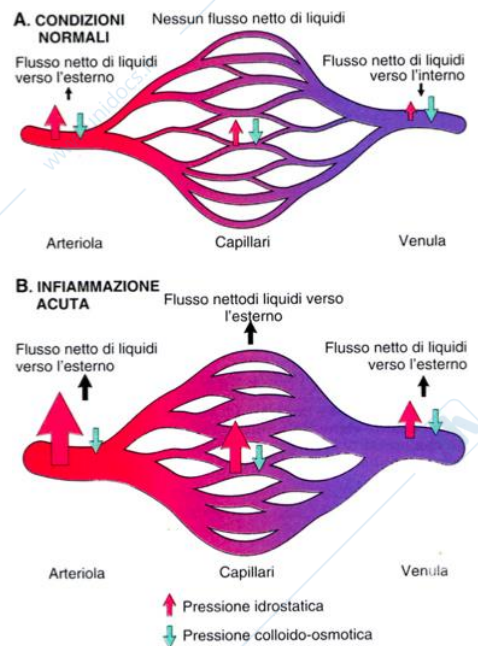
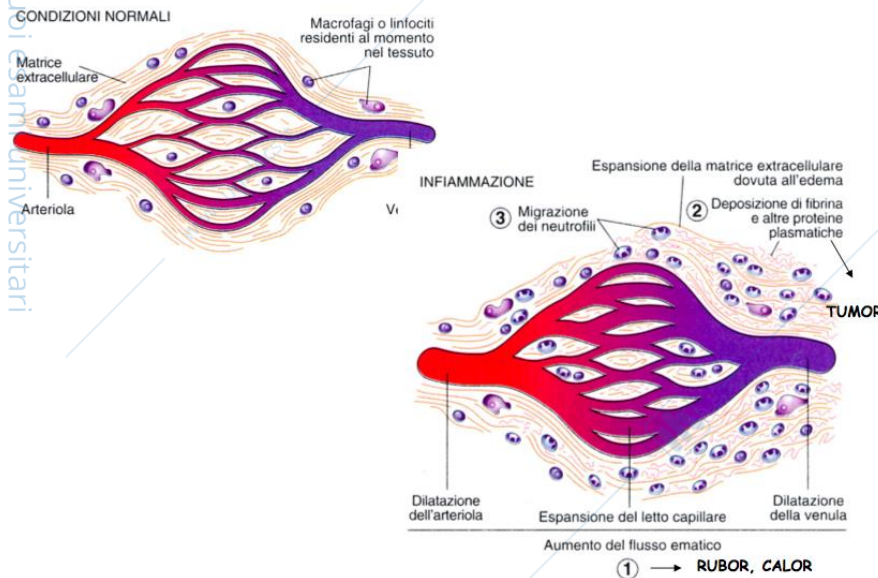
sull'arginina, piuttosto che agire sull'enzima stesso.

Il *secondo evento vascolare* è la formazione di edema, ovvero l'accumulo di liquido negli spazi extracellulari che causa gonfiore. Due sono i meccanismi importanti:

- Aumento della pressione idrostatica;
- Aumento della permeabilità vasale.

In un microcircolo normale, la pressione arteriosa supera quella oncologica dei tessuti che fa rientrare metaboliti all'interno del sangue mentre si ha un equilibrio nella zona capillare e il flusso si inverte nella zona venosa.

In condizioni di infiammazione acuta, la pressione aumenta e il flusso netto di liquidi va verso



l'esterno sia nella zona dell'arteriola che in quella della venula. Ne è un esempio la bolla piena di liquido che si crea a seguito di una bruciatura. Questo evento non giustifica come dopo un po' di ore, nell'interstizio transitino anche delle cellule.

Le giunzioni tra una cellula endoteliale e l'altra diventano più lasse. L'endotelio non è più un monostrato impermeabile, ma per effetto di mediatori le cellule endoteliali si restringono facendo diventare lasse le giunzioni. Fuoriesce quindi l'acqua e con essa le proteine a

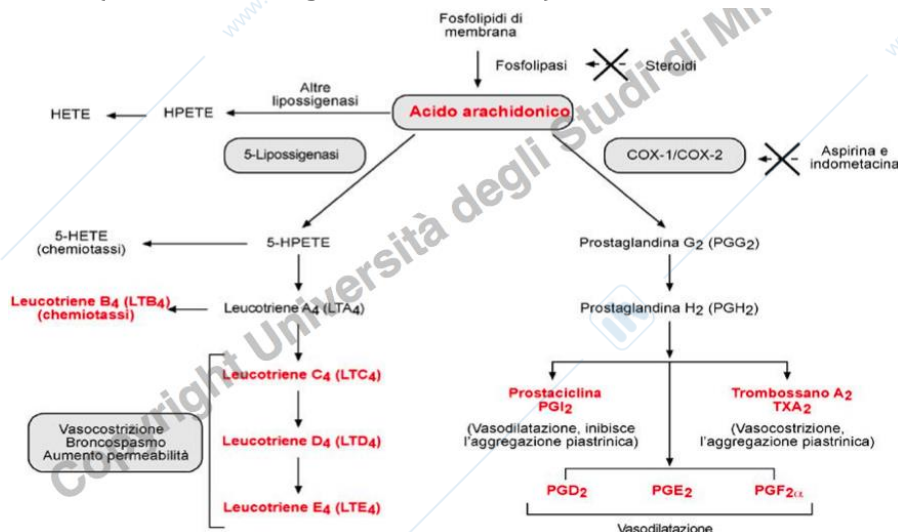
basso(prima) e ad alto peso molecolare(come il fibrinogeno e l'albumina), fuoriescono anche le proteine plasmatiche, gli anticorpi e, infine, le cellule. I mediatori permeabilizzanti sono l'istamina e le prostaglandine, mediatori di derivazione lipidica.

Le prostaglandine sono una famiglia di molecole che derivano dalla cascata enzimatica del metabolismo dell'acido arachidonico. Questo acido è liberato dai fosfolipidi di membrana, per mezzo della fosfolipasi, e viene

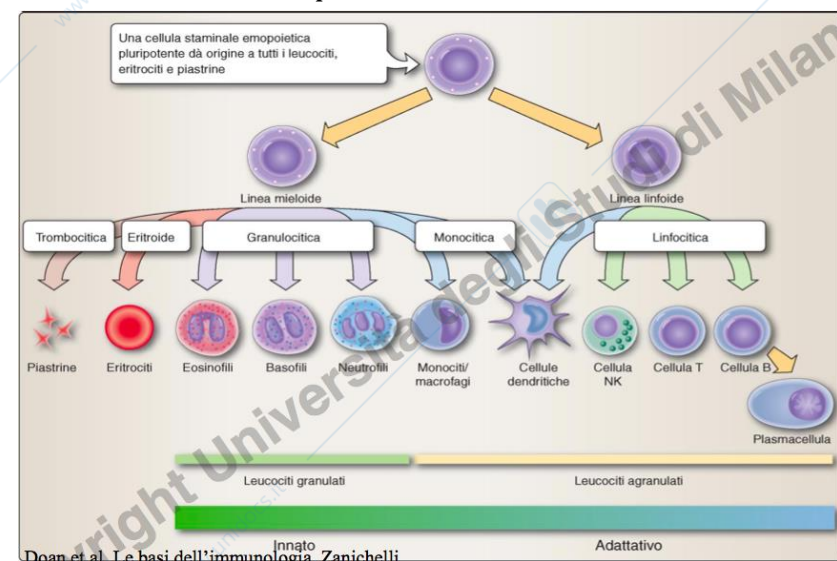
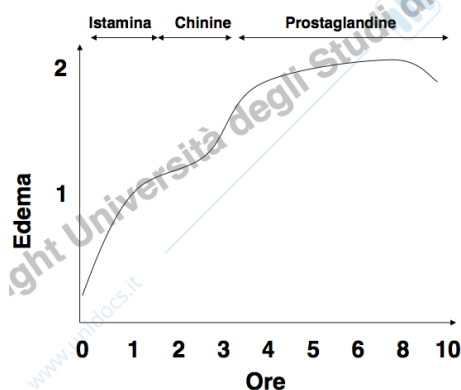
metabolizzato per via ciclo-ossigenasi(sono due, COX-1 costitutiva e COX-2 inducibile) o per via lipossigenasi.

Dalla **ciclo-ossigenasi** derivano le prostaglandine(tra cui quella di tipo E), la prostaciclina, che collabora con NO a indurre vasodilatazione, e il trombossano che facilitano l'aggregazione piastrinica. Trombossano e prostaciclina hanno attività contrastanti, rispettivamente vasocostringente e vasodilatante, e mentre la prostaciclina inibisce l'attività delle piastrine, il trombossano attiva la coagulazione. L'aspirina ha effetto antinfiammatori dovuti all'attività dei COX.

Attraverso la via della **lipossigenasi** si producono i leucotrieni che mediano la broncocostrizione, il broncospasmo e l'aumento di permeabilità. Questi processi sono un'amplificazione della risposta in cui intervengono più mediatori con più attività anche contrastanti tra di loro, la risposta del tessuto è dato dall'equilibrio di concentrazione di queste molecole. L'aumento di permeabilità grazie ai mediatori è veloce perché il substrato dell'acido arachidonico sono i fosfolipidi di membrana(substrato sempre presente) che può quindi essere metabolizzato da qualsiasi cellula, non c'è bisogno di neosintesi. Per questo l'intervento è molto rapido.



Formazione dell'edema



complemento(proteine responsabili dell'aumento di permeabilità e della chemiotassi).

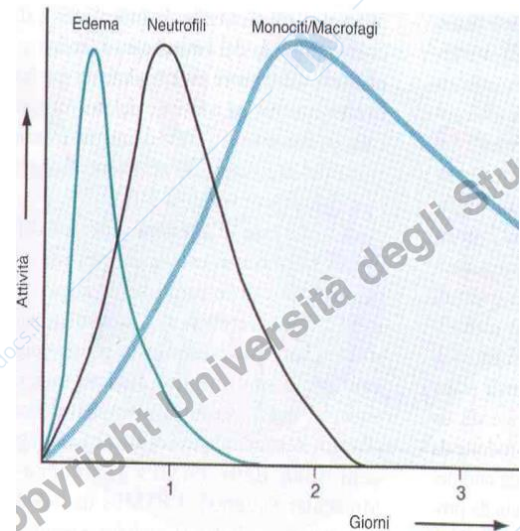
Durante l'infiammazione le cellule coinvolte sono gli endoteli che subiscono fenomeni di modifica del citoscheletro: si raggrinziscono, le giunzioni diventano più lasse, iniziano a produrre mediatori per facilitare il movimento cellulare.

Dal sangue escono le cellule circolanti ovvero i fagociti costituiti dai monociti, dai polimorfonucleati e dai linfociti.

In condizioni normali, dobbiamo avere circa 4-6 milioni di globuli rossi/mm³ e circa 4-6 mila globuli bianchi, 200-300 mila piastrine. La maggior parte del sangue periferico umano è data dai granulociti (detti polimorfo nucleati), seguiti dai linfociti e un 10-15% di monociti.

Le cellule che migrano nel processo infiammatorio sono inizialmente l'edema, seguiti da neutrofili (sono il 50% del sangue) perché sono molto fagocitici e solo nelle ore successive arrivano i monociti macrofagi. I neutrofili quando migrano al di fuori del sangue hanno una vita breve (massimo 48 ore) e se lo stimolo lesivo termina, anche la concentrazione di neutrofili nell'essudato decade facilmente. I neutrofili sono velocissimi a fagocitare, richiamano dei monociti e, quando stanno per morire, il macrofago fagocita questo insieme di polimorfonucleati e virus. La leishmania, ad esempio, sfrutta il fatto di non essere uccisa dal neutrofilo per rimanere in vita e si accresce nel macrofago. Questo meccanismo è detto "a cavallo di troia".

Durante la polmonite batterica, la risposta infiammatoria richiama i neutrofili che invadono i bronchioli e gli alveoli. Il polmone non respira più bene perché è invaso da cellule antinfiammatorie e l'aria fatica ad arrivare alle cellule. Questo tipo di polmonite è detta polmonite lobare perché vengono intaccati alcuni lobi. Questi neutrofili sono per lo più polimorfi nucleati che con la terapia vengono uccisi ma senza danneggiare il polmone in modo irreversibile, si ha una rigenerazione completa.



Essudato è l'insieme di cellule che si ritrovano negli spazi extravasali, Edema è più riferito all'accumulo di fluidi. L'essudato comprende sia fluidi che cellule.

Fase Cellulare

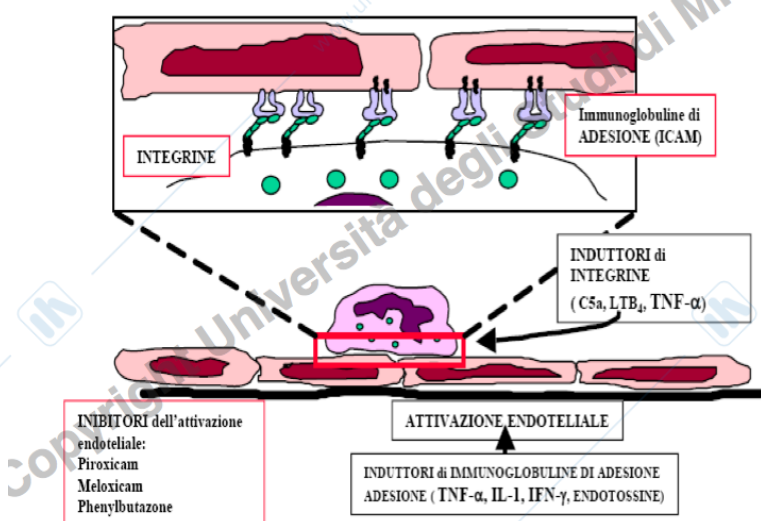
La migrazione delle cellule, detto extra-vasazione e chemiotassi, avviene in due fasi:

- Fase intravasale, iniziale di preparazione all'interno dei vasi;
- Fase interstiziale, o di movimento negli spazi al di fuori dei vasi.

Nella prima fase, detta marginazione, le cellule si spostano verso la parete del vaso su cui compaiono delle molecole di adesione che segnalano un cambiamento. Nella seconda fase, detta rotolamento, le cellule rotolano sulle cellule endoteliali ancorandosi

in modo ancora reversibile. Successivamente, nella terza fase di adesione, le cellule aderiscono all'endotelio attraverso dei legami stabili dati da altre molecole di adesione dette ligandi delle integrine e infine, nella quarta fase di passaggio, le cellule subiscono dei cambiamenti conformazionali al citoscheletro e passano attraverso gli spazi interstiziali. Il movimento dei leucociti è assicurato dal legame successivo con molecole di adesione che si attaccano e staccano

Adesione e movimenti leucocitari



avanzando tra le molecole di adesione. Questo “cammino” avviene sia nel vaso che nello spazio interstiziale.

Le molecole di adesione provengono da 3 famiglie diverse:

- Selectine, mediano l'adesione ancora;
- Immunoglobuline, rappresentano il legante ed è espressa sulla superficie endoteliale;
- Integrine, rappresentano il substrato (recettore) che è espresso dalla cellula migrante, i leucociti.

Le **selectine** sono molecole molto lunghe, con un dominio peptidico terminale e sono sempre transmembrana. Le prostaglandine sono fattori che inducono la modificazione di queste molecole. La famiglia delle selectine presenta 3 diversi membri:

le L-selectine presenti sui leucociti, le E-selectine presenti sull'endotelio attivato e le P-selectine presenti sulle piastrine e sull'endotelio.

Le **immunoglobuline** sono molecole che presentano un dominio

immunoglobulare (in VCAM-1 sono 7) di circa 110 AA con cisteine che fanno porti di solfuro, scoperti negli anticorpi. I domini sono siti a cui si legano le cellule che devono passare attraverso l'endotelio.

Le molecole di adesione sono espresse sull'endotelio attivato, non tutto l'endotelio. L'endotelio diventa visibile e le cellule aderiscono legando le **integrine** sulle cellule che devono migrare. Il legame avviene tra integrine e immunoglobuline ed è di tipo forte, stabile e irreversibile: porta all'attivazione del leucocita che si lega. Le integrine sono degli eterodimeri che in forma inattiva non trasmettono legami, mentre se vengono legate da un recettore avremo l'attivazione citoplasmatica della risposta cellulare, l'adesione forte e la modifica dell'actina che sposta la cellula.

Una volta passati attraverso l'endotelio i globuli bianchi hanno bisogno di muoversi nella matrice extracellulare per questo ci sono le integrine che operano la chemiotassi, ovvero il movimento mediato verso il sito di infiammazione. Questo processo avviene similmente nei tumori che si autosintetizzano le molecole di adesione per poter fuoriuscire.

Molecole di adesione	Distribuzione	Ligando	Funzione
Selectine •L-selectina (CD62L) •E-selectina (CD62E) •P-selectina (CD62P)	•Leucociti-linfociti T •Endotelio attivato •Granuli piastrine endotelio	•Glicosaminoglicani •Glicoproteine LewisX attivato •Lewis X attivato, glicani	•Rotolamento e adesione leucociti •Adesione leucociti, monociti, linfociti. •Adesione neutrofilii, monociti, linfociti
Molecole di adesione	Distribuzione	Ligando	Funzione
•ICAM-1 •ICAM-2 •VCAM-1 •PECAM-1 (CD31)	•Endoteli attivati da citochine •Endoteli •Giunzioni endoteliali	•LFA-1, VLA-4 •VLA-4 •PECAM-1	Adesione cellula-matrice, adesione leucocitaria, attivazione e migrazione

Molecole di adesione	Distribuzione	Ligando	Funzione
•VLA1-4 •CD11aCD18 (LFA1) •CD11bCD18 (CR3) •CD11cCD18 (CR4)	•Leucociti, linfociti T •Linfociti T e B, timociti, monociti •Linfociti T, leucociti •Leucociti, monociti, linfociti	•Collagene, laminina, fibronectina •ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 •iC3b, fibrinogeno, fattore X, ICAM-1 •iC3b, fibrinogeno	•Adesione cellula-matrice •Adesione leuc-endotelio, linfociti T-APC •Adesione leuc. fagocitosi, cellula-matrice •Adesione leuc. fagocitosi, adesione cellula-matrice

8/03/2016

La chemiotassi è un movimento orientato di leucociti dal sangue ai tessuti periferici grazie a un gradiente di fattore chemiotattico. I fattori chemiotattici possono essere:

- Derivati batterici, detti fattori “classici”, componenti la parete batterica LPS nei gram-;
- Derivati lipidici, come quelli che derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico, in particolare i leucotrieni;
- Derivati del complemento, come le proteine plasmatiche;

La famiglia delle chemochine è in realtà una superfamiglia di proteine basiche che presenta circa 50 diversi membri a basso peso molecolare (8-10 kDa) ed ha due ruoli fondamentali:

- Omeostatico, servono ad indirizzare le cellule verso gli organi a cui sono destinate (esempio, una cellula uscita dal midollo osseo verso il linfonodo oppure una cellula);
- Infiammatorio, responsabili della migrazione verso l'infiammazione.

Le chemochine sono state divise in 4 diverse famiglie in base alla sequenza aminoacidica. Le prime due (le più numerose, CX e CC) sono costituite da 4 cisteine: 2 in posizione carbossi-terminale, 2 in posizione N-terminale. A seconda che le prime due cisteine siano vicine tra loro o frammentate da un altro aminoacido cisteina si differenziano le classi:

- CXC che hanno un amminoacido X in mezzo
- CC che ha le due cisteine attaccate

Sono proteine codificate i cui geni si trovano in cromosomi diversi: quelli della famiglia CXC, per esempio, si trovano nel cromosoma 4 e nel 10; quelle della famiglia CC si trovano addirittura distribuite in 4 cromosomi, il 17, il 16, il 9 e il 2. Probabilmente questi sono geni molto antichi che si sono moltiplicati nel tempo fino ad arrivare ai mammiferi e poi si sono distribuiti nei diversi cromosomi.

Abbiamo altri 2 membri particolari di questa superfamiglia che si distinguono:

- Linfotassina (o linfotattina) che è codificata nel cromosoma 1 e che ha un sola cisteina e quindi non fa alcun accoppiamento(C);
- Factalchina, codificata nel cromosoma 16 e che ha 3 cisteine(CX3C);

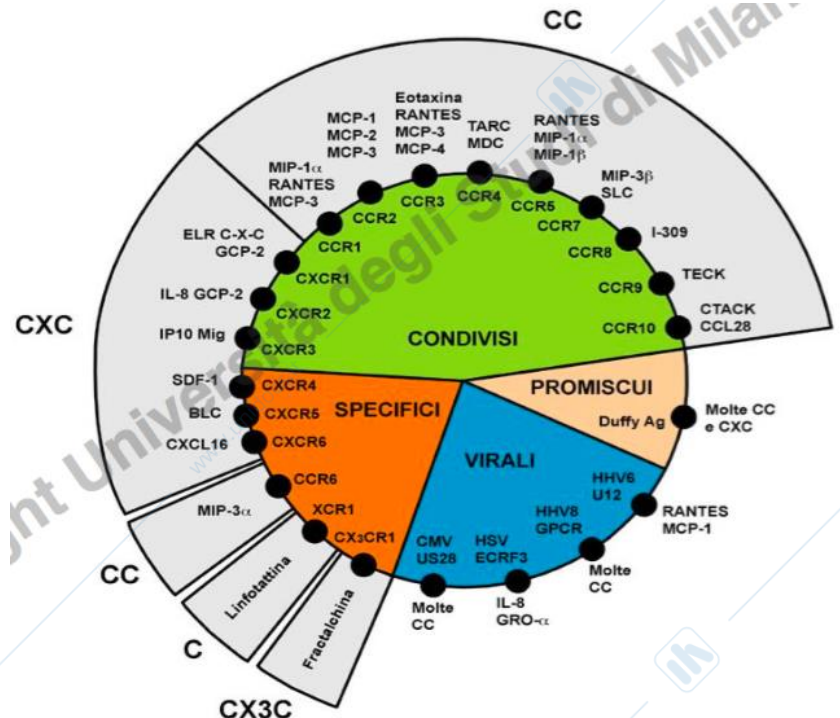
La disposizione dei ponti disolfuro spiega l'organizzazione strutturale complessa di queste molecole. Le chemochine interagiscono con dei recettori di membrana che sono attaccati a delle proteine G e che quindi trasmettono un segnale al citoscheletro (segnale intracellulare).

I recettori per questa famiglia possono essere specifici, come accade per la linfotassina e la factalina che riconoscono un recettore specifico che lega solo loro, ma la maggior parte dei recettori sono condivisi, ovvero utilizzati da più chemochine ciò permette ad ognuna di loro di avere più tessuti bersaglio ed ampliare la loro azione.

Ogni famiglia di chemochine ha diversi tipi di recettori. I recettori, sempre per la stessa nomenclatura si distinguono in recettori CXC, cioè che interagiscono con le proteine CXC e recettori CC che interagiscono con le altre chemochine. Alcuni di questi recettori come CCR3 interagiscono con più recettori, in questo esempio 4 chemochine (RANTES, MPC3, MCP4, EUTASSINA)

Ci sono anche recettori virali e promiscui.

I recettori promiscui legano molte chemochine. Duffy Ag (=Antigen) ad esempio è uno dei marcatori dei globuli rossi, fa parte del gruppo di antigeni ABO che caratterizzano il fenotipo dei globuli rossi e dei gruppi sanguigni; è poco diffuso nella regione mediterranea e molto diffuso in Africa dove colpisce il virus Diba che usa questo recettore per entrare nei globuli rossi. Questo antigene per i globuli rossi è diffuso in molti tessuti e ci si legano molte chemochine CC e CXC.



Ci sono poi i recettori virali: i virus una volta infettate le cellule producono questi recettori e reagiscono legando molte chemochine dell'organismo.

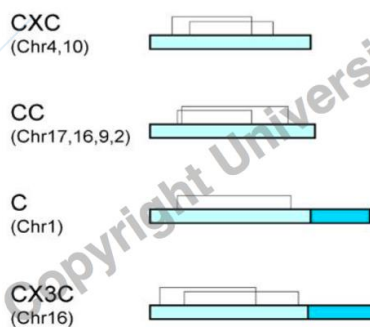
CCL vuol dire legante, CCR vuol dire recettore.

Le chemochine della famiglia CC reclutano globuli bianchi di tipo linfocitario e monociti in minor misura. Rappresentante: RANTES (CCL5) reclutamento di diversi tipi di leucociti (linfociti e monociti in particolare). Si trova in molte reazioni infiammatorie, specialmente di tipo infettivo. Mentre le chemochine della famiglia CXC richiamano principalmente i polimorfonucleati neutrofili, cioè i fagociti neutrofili. Rappresentante: CXCL8 (IL-8, interleuchina 8) reclutamento neutrofili. Una delle più prodotte quando si reclutano neutrofili, soprattutto per infezioni batteriche.

Le chemochine sono quindi cruciali per la formazione dell'essudato infiammatorio perché sono quelle molecole che permettono la fase finale dell'extravasazione; dirigono i globuli bianchi una volta usciti fuori dal vaso al sito della lesione/infiammazione. Servono per amplificare la risposta infiammatoria in breve tempo. Sono importanti per dirigere la migrazione dei linfociti, specialmente linfociti T che quando fuoriescono dal timo maturi ma inattivati (naive) devono essere indirizzati nei diversi linfonodi o tessuti linfoide dalle chemochine. Sono sempre le chemochine che nel caso di una risposta di memoria (quella ricorrente nella risposta immuno-specifica) che indirizzano i linfociti di memoria verso il sito di infiammazione (housekeeping o cosiddetto ruolo omeostatico).

Le chemochine possono anche regolare la distribuzione delle molecole d'adesione sulle cellule che devono migrare. Su una scala dei tempi dall'inizio dell'infiammazione prima compare la P-selectina, una delle prime molecole di adesione necessarie per far rotolare i globuli bianchi, e poi uno dei segnali più importanti per la presentazione in superficie delle P-selectina, l'istamina. Quando il processo infiammatorio si amplifica vengono prodotte chemochine ma anche citochine infiammatorie tipo tumor necrosis factor o interleuchina 2; compaiono sulla superficie delle cellule endoteliali le cellule di tipo immunoglobulinico e sulla superficie delle cellule che devono migrare compaiono le integrine. Sono proprio le chemochine che fanno sì che queste integrine modifichino la loro conformazione in modo che l'affinità delle integrine per ICAM e VCAM diventa molto alta e quindi avremo la possibilità della migrazione forte, quindi dell'extravasazione.

Nei primi tempi dopo l'attivazione compaiono sulla superficie endoteliale prima le selectine, poi le molecole di tipo immunoglobulinico e le altre scompaiono. I recettori delle chemochine sono anche usati dai virus e sintetizzate dai tumori, soprattutto quelli metastatici.

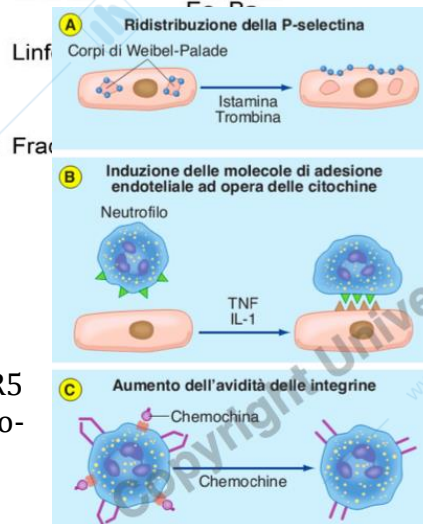


IL-8, IP-10, SDF1, BCA-1
 Neu T, NK, B

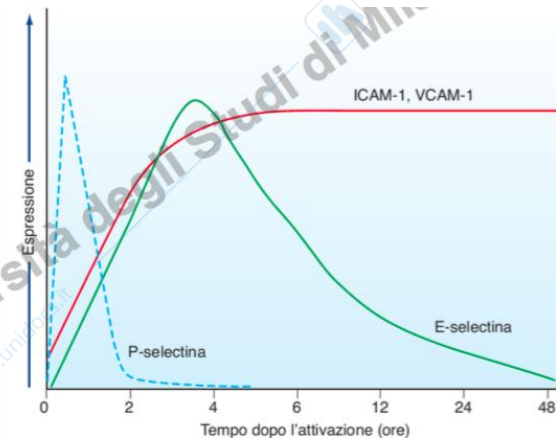
CXCR1,2, CXCR3,4, CXCR5

MCP, MIP, 6CCKs
 Mo, DC, T, B, NK

CCR1-10



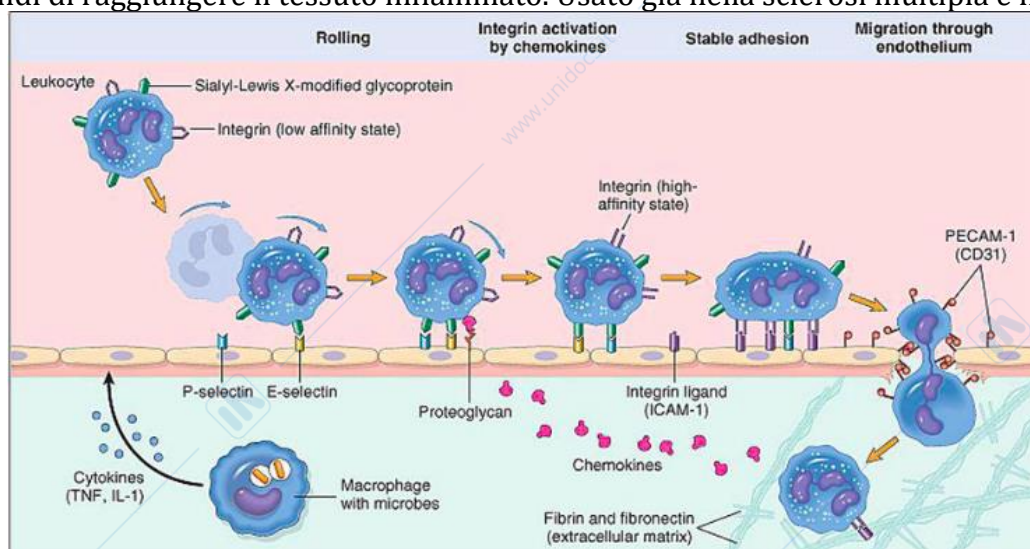
Ad esempio il CCR5 e CXCR4 sono co-recettori del virus dell'HIV; il primo recettore è il CD4 che lega la GP120 nella superficie del virus. Quando



questo si è legato cambia di conformazione e il secondo recettore, per esempio CCR5, deve interagire con la GP14 del virus, il legame è forte e così si possono infettare le cellule. CCR5 è stato scoperto come uno dei co-

recettori di HIV perché si vide che sottoponendo le colture di linfociti T e infettandole con il virus in presenza di RANTES (fattore solubile), la duplicazione virale veniva ridotta e inibita perché RANTES occupa il recettore CCL5 e compete con il virus. Ha quindi un'attività HIV. L'ipotesi fu confermata da studi di popolazione in cui si vide che alcuni individui omozigoti, per una mutazione non esprimevano CCL5 e non erano infettati da HIV. Sono casi molto rari perché c'è una doppia mutazione sul CCL5.

Quando parliamo di infiammazione cronica, l'infiammazione persiste e con essa l'essudato che reca danno ai tessuti circostanti. Per rispondere al danno si usano farmaci anti-infiammatori che bloccano la produzione di fattori infiammatori (leucociti e leucotrieni) oppure esistono gli anticorpi monoclonali che bloccano il recettore per le chemochine o la chemochina stessa. Uno di questi già usato in clinica è Natalizumab: anticorpo monoclonale (terminazione in -mab) che riconosce l'integrina $\alpha 4$, espressa sui globuli bianchi, che è la molecola di adesione usata sia per interagire con endotelio che con la matrice. Questo Natalizumab previene l'adesione dei leucociti al loro recettore (VCAM-1) e quindi impedisce il passaggio dei globuli bianchi attraverso l'endotelio e quindi di raggiungere il tessuto infiammato. Usato già nella sclerosi multipla e nel



morbo di Crohn.

Fagociti Mononucleati, Monociti, Macrofagi, Polimorfo Nucleati

Molte delle cellule che partecipano a questa migrazione a partire dal letto vasale alla fine dell'infiammazione tornano in circolo, altre muoiono lì. I polimorfo nucleati neutrofili muoiono nel sito di infiammazione e proprio nel morire distribuiscono sulla superficie dei batteri una sorta di rete (detta "net") fatta del loro citoplasma che ingloba i batteri facilitando la fagocitosi da parte dei macrofagi.

Le cellule che migrano per prime sono i polimorfonucleati, che sono anche i più abbondanti nel sangue periferico; poi i monociti (monocita si riferisce alle cellule fagocitanti quando sono circolanti)/macrofagi (si riferisce invece alle cellule fagocitanti divenuti tissutali: la vita di questi è più lunga, cambiano le loro caratteristiche e producono fattori di attivazione per le altre cellule). Queste due popolazioni costituiscono la famiglia dei fagociti mononucleati per il loro ruolo fagocitante.

Lungo la linea temporale abbiamo in successione:

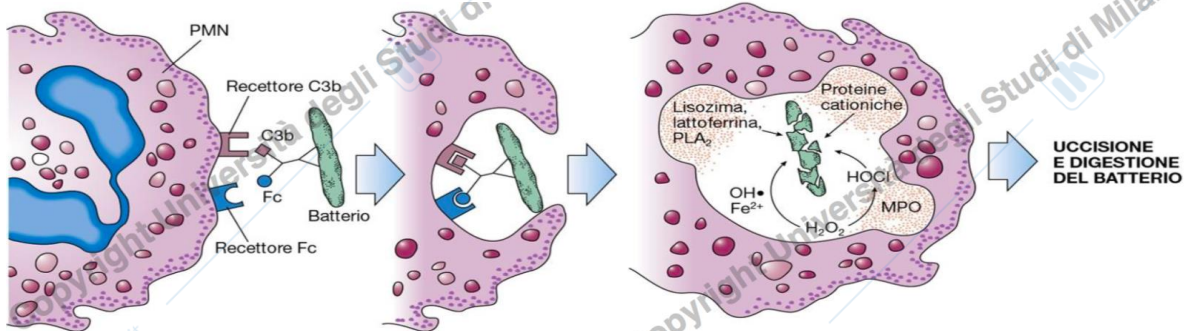
- 1) Edema
- 2) Afflusso di neutrofili (dopo 48-72h muoiono una volta svolte le attività)
- 3) Monociti macrofagi

Fasi della fagocitosi:

Inizialmente c'è il *riconoscimento* sia del batterio ma anche di un detrito cellulare (in seguito, ad esempio, alla necrosi che porta la disgregazione della cellula e quindi la formazione di detriti) che devono essere riconosciuti tramite recettori. Poi si ha un'adesione di tipo forte del batterio sulla superficie del fagocita grazie a questi recettori. Successivamente, un'internalizzazione in cui

la membrana subisce un'invaginazione molto attiva: il citoscheletro si muove, l'actina si polimerizza e depolimerizza per portare alla formazione del fagosoma, ovvero il corpo di fagocitosi. È una vescicola dentro cui rimane bloccata la sostanza fagocitata. Infine si ha la *distruzione* quando il fagosoma si fonde con i lisosomi citoplasmatici e si forma il fagolisosoma: gli enzimi di questi lisosomi vengono riversati in questa vescicola e si ha distruzione del patogeno o del detrito.

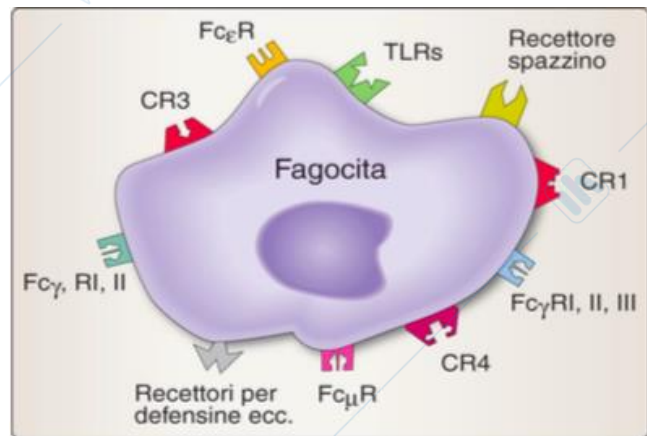
Questo è lo stesso meccanismo di azione delle amebe, quindi il sistema è molto antico.



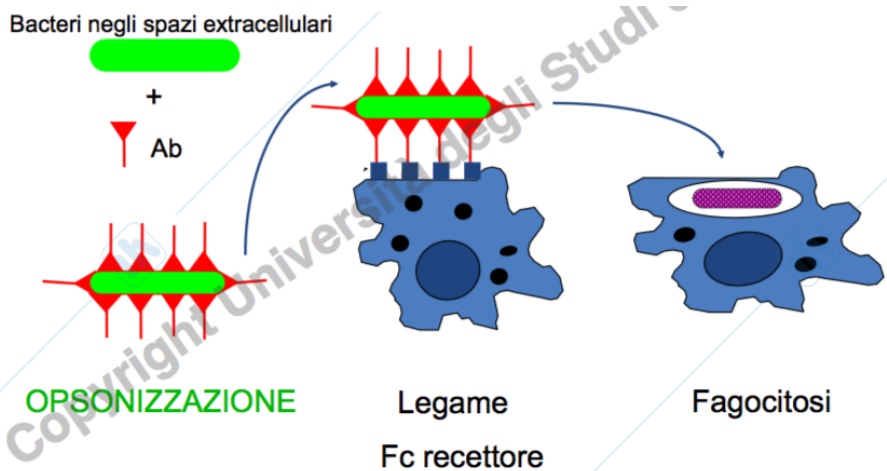
Ci sono anche sistemi di riconoscimento sulla superficie dei fagociti. Abbiamo 2 classi di recettori:

1. Recettori di fagocitosi, essenziali per il riconoscimento e l'adesione dei patogeni/detriti cellulari, sono divisi in:

- Recettore *scavenger* (=recettore spazzino) che lega i corpi apoptotici, direttamente i patogeni (con bassa affinità) e detriti cellulari. È uno dei recettori che lega le LDL ossidate (lipoproteine a bassa densità ossidate) nell'arteriosclerosi. E' un recettore abbastanza ubiquitario ed antico.
- Recettore per il mannosio: usato per il riconoscimento di funghi e lieviti come la candida albicans che ha una parete fatta di glucomannani, mentre altri lieviti hanno i galattomannani. Proprio questi mannosidi presenti nella parete di funghi e lieviti vengono riconosciuti dai fagociti.



- Recettori Fc (=recettore per il frammento cristallizzabile Ab, dove Ab sta per anticorpi): recettore che lega la porzione costante degli anticorpi. E' tipico di organismi evoluti. Gli anticorpi sono costituiti da due

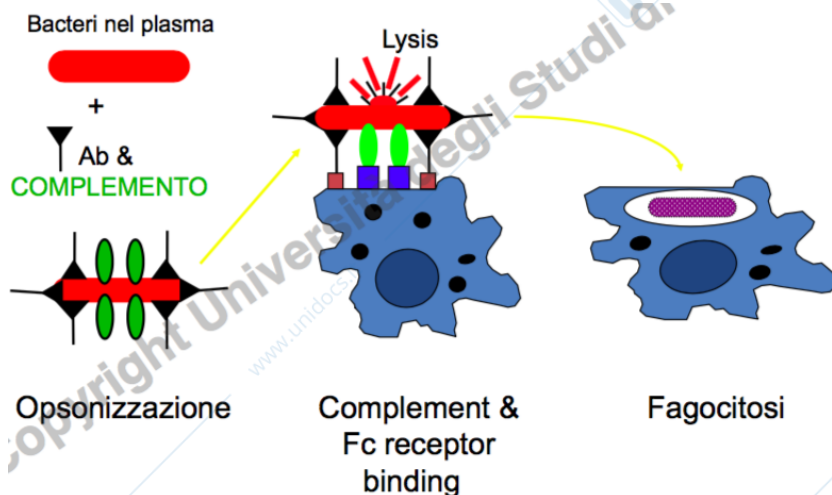


catene pesanti e due catene leggere; una porzione della catena pesante è costante (non quella che lega l'antigene che è quella variabile). Su questa porzione costante ci sono dei siti che legano il recettore sui fagociti. Se abbiamo un fagocita che esprime sulla superficie dei recettori Fc (opsonizzazione: riconoscere un batterio da parte degli anticorpi); gli anticorpi si legano attraverso la porzione costante al recettore Fc sul macrofago e la

fagocitosi sarà facilitata: si basa infatti su un principio di specificità, ovvero l'anticorpo sarà specifico per questo patogeno.

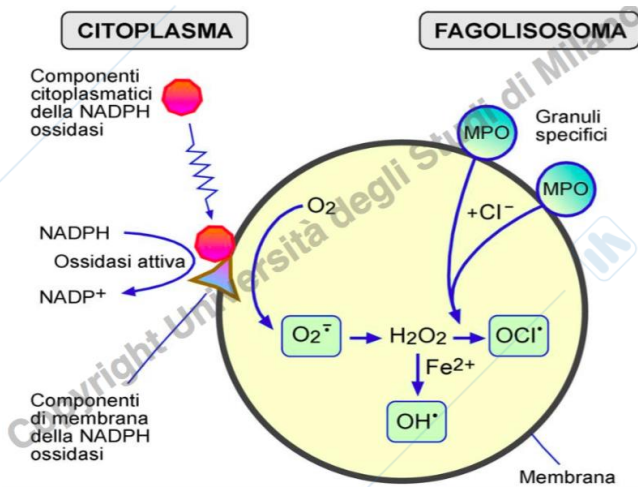
L'opsonizzazione è un punto di legame tra l'immunità innata, rappresentata dai fagociti e l'immunità specifica data dalla specificità dell'anticorpo: collaborazione tra le due grazie a questo fenomeno.

- Recettori per il complemento (Cr3 e Cr1): sono recettori che legano le proteine del complemento 1 e 3 che si attivano durante il processo infiammatorio. Il complemento è rappresentato da una serie di proteine plasmatiche che una volta attivate possono legarsi sia al fagocita che ai patogeni provocando un meccanismo "a cascata". Queste proteine sono in grado di legare i batteri nel plasma e alcuni componenti del complemento possono anche legare i fagociti tramite il recettore per il complemento, quindi il legame fagocita-complemento con attivazione del complemento può portare a una lisi del batterio ma anche a una fagocitosi più efficiente. La maggiore efficienza della fagocitosi è data da due effetti: la presenza degli anticorpi, se ci sono, e la presenza del complemento (c'è sempre). In assenza di questi due fattori la fagocitosi c'è sempre ma l'inglobamento sarà meno efficiente.



Nei lisosomi ci sono proteine basiche (lisozima, lactoferrina), proteine cationiche che distruggono la membrana e all'interno del fagolisosoma (nel vacuolo) avviene il *burst-respiratorio*, un'esplosione respiratoria, ovvero aumenta di molto il consumo di ossigeno di queste cellule durante la fagocitazione. Il consumo di ossigeno è dato dalla necessità di produzione di radicali liberi dell'ossigeno che sono quelli che distruggeranno le membrane cellulari dei batteri o delle cellule inglobate in generale.

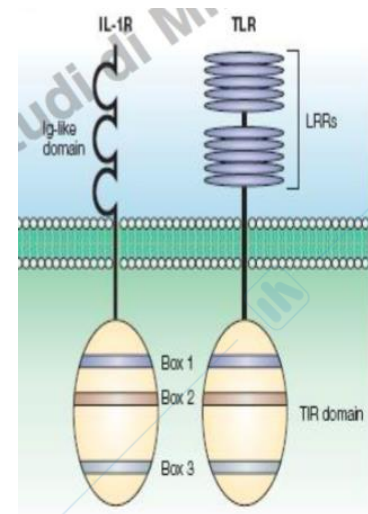
Da questo *burst* respiratorio vengono prodotti acqua ossigenata e anione superossido. Il sistema enzimatico più importante che produce questi radicali liberi dell'ossigeno è quello della NADPH-ossidasi: è un sistema enzimatico di più subunità, alcune delle quali si trovano sulla membrana dei fagolisosomi (2 unità); una componente è citoplasmatica e si attiva per poi legarsi con la componente di membrana. Queste due componenti dipendono dall'attivazione della NADPH ossidasi. Quando si attiva questo sistema dall'ossigeno si ottiene anione superossido che dismuta in acqua ossigenata che in presenza di ferro può originare OH radicale, mentre in presenza di mieloperossidasi (enzima) e di ioni cloro si forma ipoclorito (ovvero candeggina che digerisce la barriera batterica fungendo da disinfettante).



Questo sistema della NADPH-ossidasi è così importante che esiste una malattia a base genetica a lui associata, la malattia granulomatoso cronica. Questa patologia è una reazione tissutale a delle sostanze indigeribili che è caratterizzata da:

- Assenza di uno o più dei componenti del sistema enzimatico della NADPH-ossidasi;
- Nel 70% dei casi il difetto è X-linked (cioè legato al cromosoma X, quindi il gene della NADPH-ossidasi sta in questo cromosoma, solitamente si manifestano nel maschio mentre le donne sono solo portatrici) e nel 30% dei casi si manifesta come malattia autosomica recessiva.
- Mancanza il *burst-respiratorio*, cioè incapacità di produrre radicali liberi dell'ossigeno. Anche per i patogeni normalmente digeribili c'è una continua crescita.
- Incapacità di uccidere i batteri fagocitati: i batteri continuano a crescere, i macrofagi cercano di circoscrivere queste zone di crescita batterica richiamando altri macrofagi e formando granulomi che sono delle reazioni tissutali di confinamento e tentativo di uccisione di questi patogeni. In condizioni normali (non patogene), questi granulomi si sviluppano solo per patogeni gravi come per la Tuberculosis. Chi ha questa malattia produce granulomi anche per i batteri saprofiti (=non patogeni) che diventano tossici.

2. **Recettori di attivazione:** il macrofago deve fagocitare ma nel contempo deve anche segnalare alle molecole attorno cosa fare. Per esempio, le molecole di adesione vengono modulate quando c'è una stimolazione batterica o una necrosi. Per modulare i segnali nell'ambiente circostante vengono prodotti dei segnali (come le citochine) e il macrofago che è un produttore di questi segnali riceve anche lui stesso lo stimolo a farlo. Sono stati collettivamente inclusi nel termine "pattern recognition receptors": sono dei recettori che riconoscono dei pattern, cioè degli insiemi molecolari che caratterizzano di solito i patogeni. Un esempio di pattern è LPS (=lipopolisaccaride), comune a molti batteri, per cui i macrofagi hanno sviluppato un recettore ad hoc così da riconoscerlo. Nella parete dei gram+ ci sono gli acidi teicoici che sono sempre un pattern riconosciuto da questi recettori.



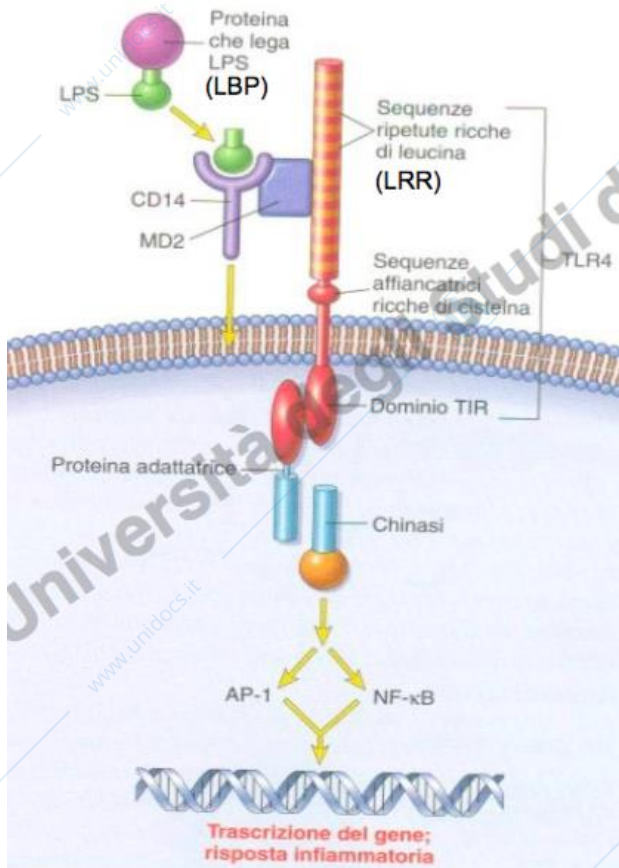
Questi recettori includono i recettori di tipo Toll. I patterns dei microrganismi riconosciuti da questi recettori sono componenti unici dei microrganismi, non sono mai presenti nell'ospite e sono detti PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns): zuccheri, proteine, lipidi, acidi nucleici, LPS, acido lipoglicolico, RNA, flagellina, etc.

Recettori della famiglia Toll:

Il gene toll è stato scoperto nel 1988 nel moscerino della frutta (*drosophila melanogaster*). Si scoprì che questo gene Toll regolava la dorsoventralità della drosophila. Nel 1996 fu scoperto che se, facendo una drosophila senza questo gene Toll (knock-out genetico), si otteneva un moscerino con problemi di dorsoventralità e soprattutto questa si ricoprì in breve di funghi (morte insetto). Nel 1995, si vide che nell'uomo è uno (oggi sappiamo che sono 10-13) dei geni responsabili del riconoscimento dei pattern batterici, fungineo, virali che una volta attivati trasmettono il segnale di attivazione dell'immunità innata. Non è un segnale di fagocitosi, ma di attivazione della cellula fagocitotica (non ne è il mediatore).

I recettori Toll sono costituiti:

- da una porzione extracellulare abbastanza ripetitiva con dei segmenti ricchi in leucina;
- una porzione transmembrana;
- una porzione citoplasmatica, il dominio TIR, che caratterizza questi recettori e trasmette il segnale di attivazione alla cellula.



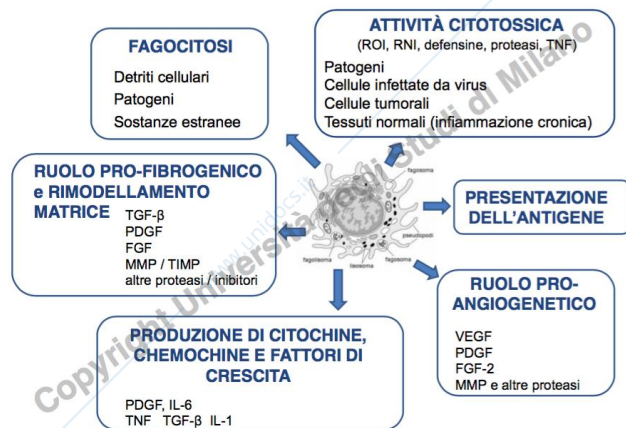
I recettori di tipo Toll sono simili ai recettori dell'interleuchina 1 per le citochine infiammatorie che presentano lo stesso dominio Tir. Questo dominio citoplasmatico indica che i due recettori sono correlati in qualche modo.

I recettori Toll riconosciuti dell'uomo sono 9: ciascuno ha un dominio intracellulare che trasmette il segnale, mentre i domini extracellulari sono diversi. Ad esempio, Toll4 riconosce tutti gli LPS di tutti i Gram-, Toll2 riconosce il lipopeptide micoplasma, Toll2 e Toll1 riconoscono i lipopeptidi di Gram+, Toll1 riconosce anche il DNA a doppia elica Toll5 riconosce la flagellina, il Toll7 riconosce l'RNA a singola elica, il Toll9 riconosce del DNA batterico, etc. C'è una selezione: questi recettori riconoscono pattern specifici dei patogeni e trasmettono in ugual modo il segnale alla cellula. La modalità di trasmissione del segnale è uguale per tutti i recettori, ciò che cambia sono i determinanti di superficie che legano i patogeni. I due fattori di trascrizione che nel sistema immune sono più coinvolti sono NF-KB e AP-1, proteine citoplasmatiche che quando vengono

attivate per fosforilazione traslocano al nucleo. Traslocando si legano ai siti dei promotori a monte (5') di molti geni responsabili della risposta immune attivandoli.

Un macrofago da un lato fagocita grazie ai recettori per la fagocitosi però attiva anche lo stesso batterio che ha sempre l'LPS. Un macrofago attivato (a parte fagocitosi) comincia a produrre una serie di fattori, dette "linfocine" o più genericamente citochine, che possono avere:

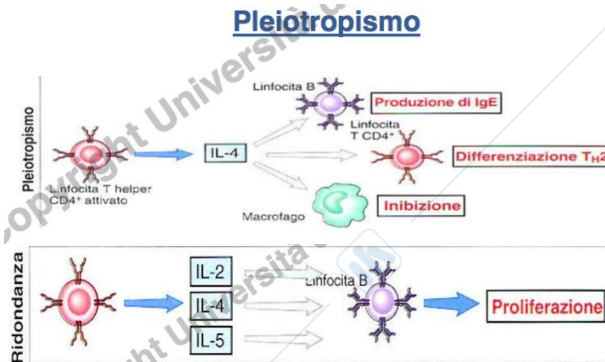
- Attività citotossica, questa facilita l'eliminazione dei patogeni. I primi prodotti di un macrofago attivato non sono citochine ma radicali liberi dell'ossigeno o dell'azoto (si attiva NO-sintasi con produzione di NO tossico);
- Ruolo pro-angiogenetico, cioè produzione di nuovi vasi. Una volta attivato produce fattori, il più importante dei quali è il VEGF, per riformare la parte danneggiata;
- Ruolo pro-fibrogenico e rimodellamento della matrice (riparazione matrice). Il macrofago fagocita e inizia anche la fase del riparo producendo fattori di crescita come le citochine, chemochine e fattori di crescita (fase di amplificazione della risposta). I fattori di crescita servono alle cellule vicine per moltiplicarsi, devono proliferare per ricostruire vasi e matrice. Il macrofago ha anche il dovere di presentare gli antigeni esogeni ai linfociti T (sono parte dell'immunità specifica ed interagiscono con l'immunità innata, i macrofagi).



Le Citochine

Le citochine a differenza delle chemochine sono molecole più grandi (11-20kDa). Il termine collettivo indica proteine prodotte da diversi tipi cellulari, ovvero sia da parte di endoteli attivati che da parte dei globuli bianchi/macrofagi/monociti/linfociti.

Rispondono a degli stimoli (come microorganismi: vedi segnali tramite Toll) o ad altri segnali. Queste citochine, a loro volta, interagiscono con dei recettori e dai recettori ne può derivare una risposta stimolante o inibente (citochine inibitorie e citochine stimolatorie). Una stessa citochina può produrre effetti inibitori o stimolatori a seconda del bersaglio cellulare. Pleiotropismo: una stessa citochina può muoversi, legarsi (quindi avere recettori) a più cellule di



tipo diverso. Ad esempio se un linfocita T produce interleuchina 4, questa può agire sui linfociti B che producono IgE, sui linfociti T che si differenziano oppure sul macrofago e vengono inibiti.

Inoltre, le citochine sono ridondanti: citochine diverse inducono attività simili. Questo fenomeno amplifica notevolmente la risposta nell'immediato, ma diventa un problema quando con dei farmaci o degli inibitori si cerca di bloccare questi meccanismi.

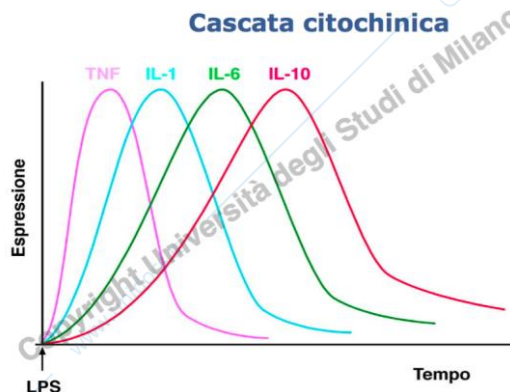
L'azione delle citochine è di breve durata che si autolimita. Le citochine di solito agiscono nel microambiente dove sono prodotte, difficilmente hanno effetti sistemici a meno che vengano prodotte in grande quantità come accade ad esempio nella febbre.

Le citochine tra di loro si influenzano: la sintesi di una citochina può indurre quella di un'altra. Interagiscono e trasmettono il segnale tramite il riconoscimento di recettori specifici con elevata specificità che una volta ingaggiati questi recettori iniziano una trasmissione di segnali nel citoplasma che porta a un'attivazione nucleare.

Possono dar luogo a effetti locali in quanto possono agire in maniera:

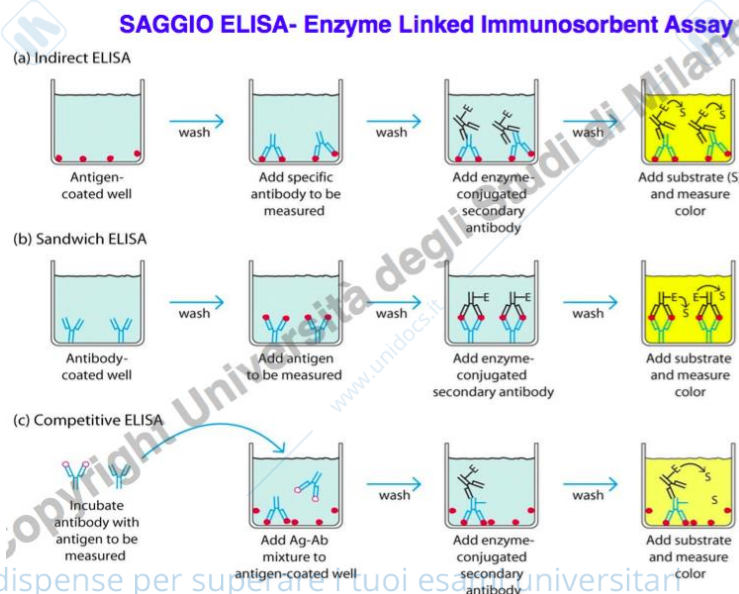
- Autocrina, cioè sulla stessa cellula che li produce;
- Paracrina, cioè nelle cellule nelle vicinanze;
- Endocrina (come ormoni), quando la concentrazione è tale che si distribuiscono in tutto l'organismo, gli effetti sono sistemici e non solo locali;

Cascata citochinica: stimolo, come l'infezione batterica da Gram- con LPS, induce un'ondata di TNF, poi di interleuchina 1, interleuchina 6 e interleuchina 10.



Le citochine ci dicono molto riguardo ad una patologia, come tumori e placche arteriosclerosi. Per indurre e dosare in vitro la produzione di citochine possiamo usare colture cellulari (tumori), cellule primarie di diversi distretti (cheratinociti della cute) o linfociti da sangue periferico umano.

Al sangue del donatore viene messo anticoagulante e viene lavato. Si esegue una separazione con sostanza resinosa (polisaccaride denso), il Ficoll: il sangue diluito (stratificato sopra) con questa Ficoll viene centrifugato e prelevandolo si vede che i globuli rossi hanno attraversato questo gradiente e si sono depositati sul fondo della provetta. In alto, ci sono il plasma e le piastrine mentre in



mezzo si forma un anello bianco prelevabile di globuli bianchi (linfociti, monociti, non ci sono polimorfo nucleati perché si trovano in parte nel Ficoll e in parte poco sopra ai globuli rossi a causa della densità). Si contano, si piastrano, si stimolano e si prelevano i surananti.

Si eseguono i test ELISA: Test biospecifico che ci permette di riconoscere proteine. Un tempo si facevano test singoli per ogni citochina, oggi esistono i test bio-plex multiplex con tecnologia luminex che usa nanosfere funzionalizzate con anticorpo che riconosce una citochina in esame e con agente fluorescente. All'interno di ogni micropiastra ci sono diverse citochine, un apparecchio legge la fluorescenza prodotta (tramite eccitazione laser) e quindi con un solo test e un solo sovrannate si possono avere tantissimi dati. Per avere dei risultati certi bisogna avere almeno tre test completamente consenzienti che vadano nella stessa direzione.

10/03/2016

Le Citochine Infiammatorie Primarie: Interleuchina 1, Tumor Necrosis Factor e Interleuchina 6

Le citochine interagiscono con i recettori cellulari di membrana trasmettendo segnali di attivazione o di inibizione. Possono agire sia a livello locale che a livello sistemico.

Le citochine infiammatorie primarie sono quelle che meglio identificano le fasi iniziali e di infiammazione di un processo infiammatorio acuto, alcune di queste citochine si ritrovano anche nel mantenimento dell'infiammazione cronica. Furono le prime scoperte perché sono le più abbondanti e facilmente prodotte dalle cellule. Interleuchina 1 e 6, pur essendo diverse, sono riunite sotto lo stesso nome perché la nomenclatura risale agli anni '70. TNF si dimostrò che inoculata in vitro in animali portatori di tumore solido nei sarcomi riusciva ad indurre necrosi emorragica dei tumori (i sarcomi del topo formano masse rosse ben evidenti sulla schiena, quindi si vedeva bene come venivano riassorbiti). Il TNF è anche una delle molecole più tossiche per i nostri tessuti quindi bisogna moderarne le quantità.

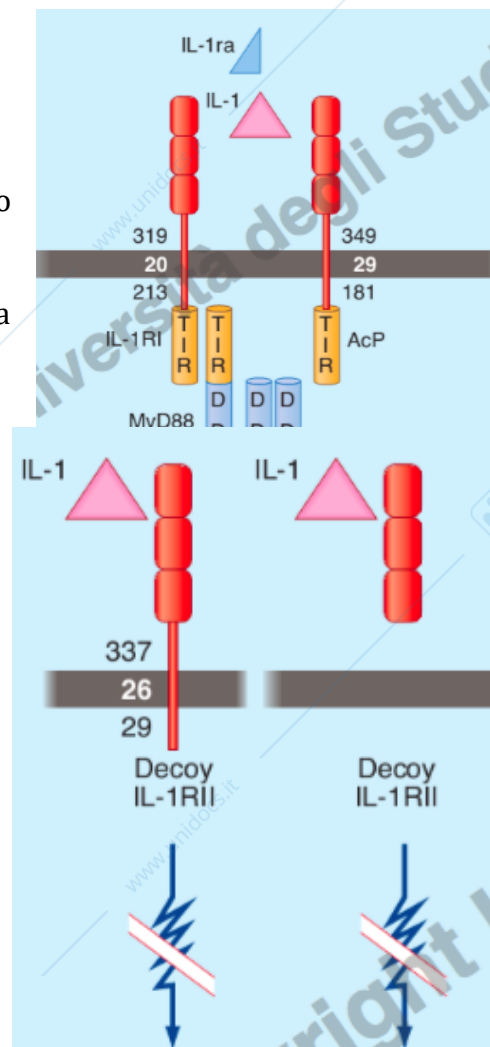
Interleuchina 1

L'interleuchina 1 è un peptide di 16 kD prodotto dai macrofagi ma anche da altre cellule endoteliali come i cheratinociti se opportunamente stimolate. È uno dei primi mediatori dell'infiammazione, molto presente e per questo scoperta tra le prime (venne chiamata LAF, Linfoside Activator Factor).

Attiva Linfociti T e B attivando il sistema specifico, a dosi elevate è in grado di innalzare la temperatura corporea infatti è uno dei mediatori più importanti della febbre. Quando raggiunge una concentrazione citoplasmatica elevata, raggiunge il talamo (dove ci sono centri di controllo della temperatura) e induce localmente la produzione di prostaglandine che mediano l'innalzamento della temperatura corporea. La febbre è un fenomeno sistemico mediato dall'interleuchina 1 che per questo fu anche chiamata "pirogeno endogeno".

Come tutte le citochine ha un'attività pleiotropica, ovvero diretta a più cellule dell'organismo. Agisce sui macrofagi stessi in modo autocrino ma può agire anche a livello di diversi distretti: a livello delle articolazioni, ad esempio, al ginocchio urtato che inizia gonfiarsi per la produzione di liquido extravasato in cui si trova molta interleuchina 1 e può agire danneggiandola. Sotto la cartilagine si trova l'osso, quindi l'attività delle interleuchine 1 in eccesso colpisce gli osteoclasti distruggendo l'osso in un processo di infiammazione prolungata.

Il sistema dell'interleuchina uno è stato molto studiato perché comprende l'interleuchina, i suoi



i

recettori e anche molecole molto simili capaci di bloccare endogenamente questa citochina.

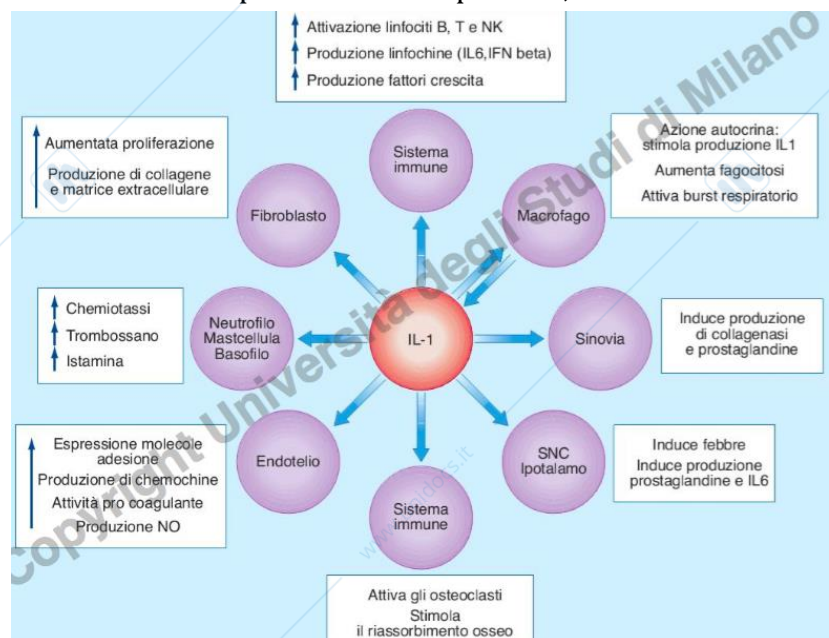
- I. C'è una regolazione: quando l'interleuchina 1 interagisce con il recettore, una proteina transmembrana che ha nella sua parte citoplasmatica il dominio TIR (già presente nella famiglia dei Toll Receptor), il dominio TIR si attiva e reagisce con un'altra molecola, MyD88, che fosforila (quindi agisce da chinasi) un substrato chiamato IRAK (=IRA kinasis) e trasmette così il segnale. Da questo si attivano altre chinasi citoplasmatiche fino ad arrivare a uno dei segnali di trascrizione più comuni del sistema immune presente nel citoplasma, NF- κ B, che si scinde una volta attivato. La porzione attiva va nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni della risposta.
- II. Esistono anche altri recettori, ad esempio, Decoy è un finto recettore perché ha porzione extracellulare identica al recettore classico dell'interleuchina 1 portando la molecola a legarsi con la stessa specificità, però nella porzione citoplasmatica non c'è il dominio TIR quindi non c'è nessuna possibilità di comunicare alla cellula cosa sta succedendo. Il segnale non parte, quindi è detto recettore finto (=decoy). Lo stesso recettore Decoy, per opera di enzimi proteolitici, può essere lasciato libero nei tessuti diventando un recettore solubile sempre in grado di legare l'interleuchina 1 bloccandola prima che raggiunga il recettore stesso.
- III. Un terzo sistema di regolazione dell'interleuchina 1 è l'IL-1ra (=receptor antagonist) di peso molecolare 10-11 kD che lega il recettore in modo che questo non trasmetta il segnale, blocca la cascata chinasi.

Fu scoperto per ultimo studiando l'IL-1 nelle urine di pazienti febbrili tramite il *Western Bloc*: si separano le proteine tramite una corsa su gel o una separazione elettroforetica per peso molecolare, le proteine vengono trasferite su una carta specifica (assorbente) che fissa le proteine su una struttura solida, si utilizza un anticorpo specifico per la proteina che si cerca (anti-corpo interleuchina 1), poi per riconoscere quale anticorpo ha legato la proteina si utilizza un anti-anticorpo marcato visualizzando direttamente la proteina e verificando se la proteina è effettivamente presente. La proteina con questo metodo fu trovata nelle urine di pazienti, ma quando si andò a testare l'attività su altre cellule (test funzionale) non si vedeva nessuna attività.

Sequenziando la proteina, capirono che l'anticorpo utilizzato per riconoscere la molecola riconosceva sia IL-1 sia questa ritrovata nelle urine solo che la sequenza di quest'ultima era più corta e non funzionale. Fu chiamata antagonista del recettore a seguito degli studi di legame perché lega il recettore ma è inibitorio dell'IL-1.

Abbiamo una molecola attiva e tre inibitori, ciò significa che la natura stessa ha bisogno di tenere sotto controllo questa molecola perché può essere molto dannosa. Il sistema di regolazione fisiologico fa in modo che l'infiammazione cessi una volta che ha fatto il suo corso.

- IL-1 è un fattore di crescita e attivazione specialmente per il sistema immunitario.
- Ha effetti anche sui macrofagi perché li stimola a produrre ancor più IL-1, aumenta la fagocitosi e attiva il *burst-respiratorio* (produzione di radicali liberi). Può attivare anche neutrofili e basofili perché induce chemiotassi, induce il tronco sano (mediatore dell'acido arachidonico attraverso la ciclossigenasi) e promuove il rilascio di istamina.
- A livello dell'endotelio aumenta l'espressione delle molecole di adesione: l'endotelio normale ha una superficie non adesiva e non aggregante mentre quando ha



inizio il fenomeno del *rolling* dei leucociti l'endotelio deve esprimere le molecole di adesione promosse da IL-1. Aumenta la produzione di chemochine, induce attività pro-coagulante: se c'è stata una lesione ai vasi, le piastrine devono intervenire. A livello dell'endoteliale IL-1 produce anche NO.

- Attiva anche gli osteoclasti e stimola il riassorbimento osseo, questa attività è positiva ma anche negativa: a seguito di una frattura prima intervengono gli osteoclasti che puliscono la zona e poi gli osteoclasti ricostruiscono l'osso. IL-1 si occupa di attivare gli osteoclasti, se però IL-1 è troppa o se continua l'infiammazione ossea l'attivazione degli osteoclasti va ad uccidere anche l'osso sano come accade ad esempio nella fuoriuscita dei denti nell'impianto osseo. Le paradontiti sono patologie che colpiscono per effetto di batteri che si instaurano nella gengiva creando un processo infiammatorio cronico che porta all'espulsione del dente perché l'osso dove è impiantato il dente è stato digerito.
- Ci può essere un effetto di danno anche a livello della membrana sinoviale delle articolazioni dove induce la produzione di collagenasi.
- A livello del SNC, nell'ipotalamo induce febbre e sonnolenza.

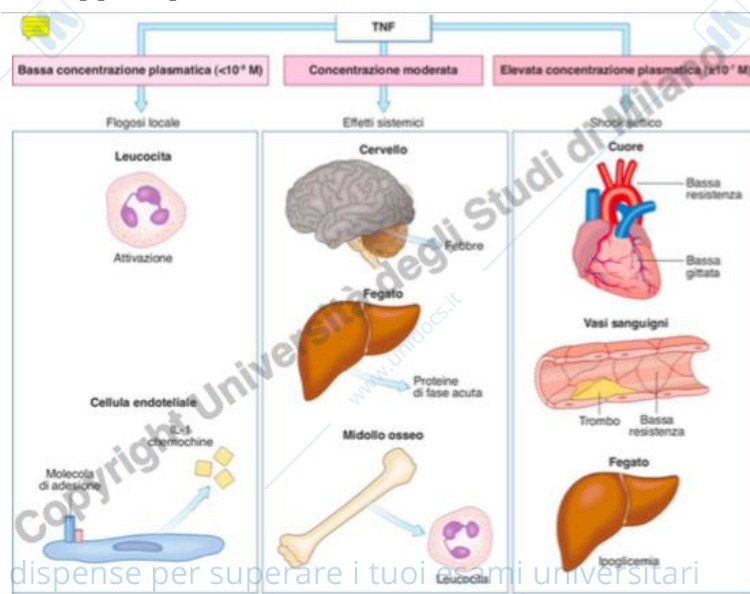
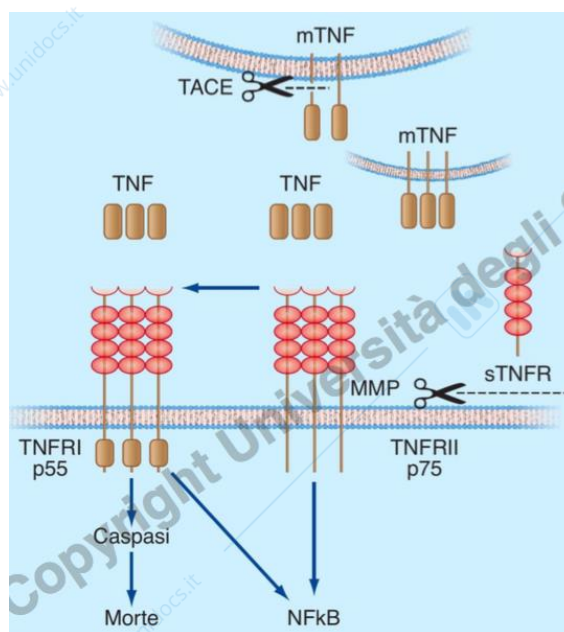
Tumor Necrosis Factor(TNF)

Come l'IL-1, TNF è prodotta da monociti macrofagi e dai neutrofili, è stimolata dai prodotti batterici tipo gli acidi lipoteicoici e liposaccaridi. Stimola gli endoteli, i leucociti e agisce a livello di molti sistemi cellulari quali fegato, apparato digerente ovvero ovunque si abbia un'infiammazione. Anche TNF è un fattore permeabilizzante, cioè aumenta la permeabilità capillare e favorisce la formazione dell'edema. E' coinvolto nel riassorbimento osseo attivando gli osteoclasti, favorisce l'attività pro-coagulante: attiva la coagulazione piastrinica e la formazione del coagulo a seguito delle lesioni. Induce aderenze, degranulazioni, fagocitosi dei neutrofili(come IL-1) e stimola la produzione di prostaglandine contribuendo alla febbre.

La grande differenza con IL-1 è la forte attività pro-coagulante e la citotossicità: è un fattore che induce necrosi(a seconda delle dosi, può provocare anche apoptosi), è citotossico perché uccide altre cellule.

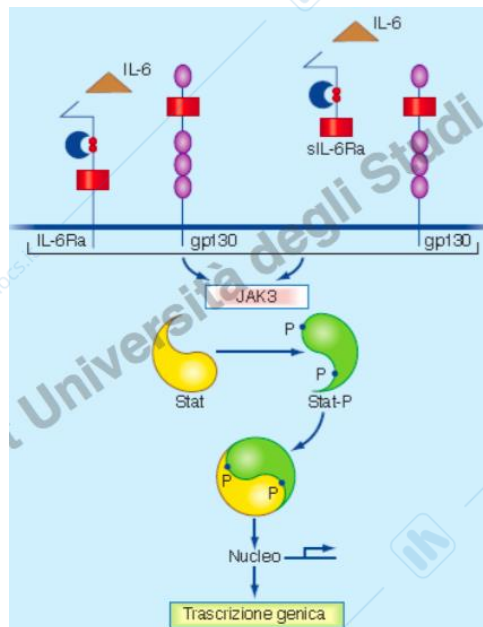
Il TNF può esistere sia ancorato alle membrane sia in forma rilasciata. Il TNF-Converting-Enzime(TACE) è un enzima che idrolizza il legame tra TNF attivo e membrana che rende TNF solubile e fa sì che venga rilasciato e agisca. Il recettore di TNF ha PM di 55kD, è di tipo I e quando viene legato dal TNF trimerizza(si uniscono tre molecole) ce può attivare le caspasi e quindi portare all'attivazione dell'apoptosi oppure portare all'attivazione del sistema di chinasi citoplasmatiche per arrivare sempre all'attivazione del fattore trascrizionale NFkB.

Un altro recettore, di tipo II con PM 75 kD, trasmette direttamente il segnale: il TNF può indurre sia necrosi che apoptosi a seconda di quanti recettori sono coinvolti. Anche nel caso del TNK, esiste un monomero del recettore solubile non in membrana, chiamato



sTNFR(soluble TNF receptor), che funziona come una molecola inibitoria: blocca il TNF prima che si leghi al recettore. Quindi il TNF è presente: in membrana, sotto forma di monomero, come trimeri che interagiscono con i recettori e attivano la morte cellulare con il sistema delle caspasi o di NFkB e in forma di recettore che blocca il TNF in soluzione, come unico metodo di controllo finora conosciuto.

Il TNF è una molecola meno controllata di IL-1 a livello fisiologico e patologico perché è controllata in modo endogeno. I suoi effetti sono diversi a seconda della dose che ne viene prodotta, può avere effetti citotossici dannosi per il tessuto e le cellule che esprimono il recettore. Se la concentrazione è meno di 10^{-9} M(bassa) l'infiammazione è locale: si attivano i fagociti, si esprimono le molecole di adesione, si producono le chemochine e si ha extravasazione, gonfiore etc. che si risolvono quando lo stimolo iniziale si esaurisce. Se la concentrazione sale e quindi la molecola si diffonde come avviene per IL-1, abbiamo degli effetti sistemici: febbre a livello ipotalamico, effetto epatico perché induce la sintesi di proteine di fase acuta. Queste proteine sono prodotte dal fegato praticamente ex-novo(perché in condizioni fisiologiche sono prodotte a livelli bassi) durante l'infiammazione, la produzione di siero-amiloide A(SAP) ne è un esempio. Il TNF è una delle molecole che inducono la produzione di proteina amiloide, tanto che le placche di amiloide sono presenti in persone che hanno infiammazioni croniche. Altre proteine che aumentano di molto durante la fase acuta, solo le proteine di tipo plasmatico come ad esempio il fibrinogeno: è sempre prodotto, ma nella fase acuta aumenta di molto la concentrazione. A



livello del midollo osseo, il TNF stimola la produzione di globuli bianchi che in periferia si riflette come leucocitosi(=aumento del numero di globuli bianchi circolanti). In condizioni normali, ne abbiamo 5-6 mila/mm³ mentre in condizioni di leucocitosi ne troviamo 20-30mila/mm³ che ci indicano un'infezione batterica o virale in atto.

Ad elevate concentrazioni di TNF(>10⁻⁷), il processo infiammatorio è molto forte e abbiamo uno shock settico. La sepsi è una patologia grave in cui un'infezione batterica è talmente prorompente che abbiamo batteri nel sangue, ne è un esempio la peritonite a seguito di una perforazione intestinale. Lo shock indica una caduta di pressione che in condizioni normali ci fa svenire mentre, in questo caso, la caduta pressoria è massiccia e dovuta ad NO(potente vasodilatatore). Questa fa calare il tono di tutti i vasi al punto tale che il sangue non torna in circolo a sufficienza e il cuore va in shock. All'interno dell'organismo si avrà una mal perfusione degli organi vitali a causa della caduta pressoria e dell'incapacità di essere irrorati e nutriti. Il TNF ha un ruolo cruciale in questo perché il suo eccesso è deleterio e quindi la ricerca farmacologica è volta a bloccarlo.

Inoltre, il TNF favorisce l'attivazione delle piastrine e la formazione di coaguli che nei vasi integri formano dei trombi. Nei casi di eccesso di produzione di TNF si manifesta il fenomeno cosiddetto DIC o CID(=coagulazione intravascolare disseminata) che può colpire distretti particolari e portare alla tumefazione del tessuto in cui il sangue non circola più. Il DIC consuma tante piastrine, ne avremo quindi una carenza. Spesso la DIC è associata alla sepsi. Il fegato se viene colpito da sepsi e DIC viene irrorato male, va in ipoglicemia e comincia a produrre le sue proteine ma poi subisce gravi tumefazioni.

Interleuchina 6

L'IL-6 ha un PM di 16 kD, è prodotta da monociti macrofagi e fibroblasti, interagisce con un recettore formato da due catene gp130. Anche in questo caso abbiamo un recettore solubile che blocca la molecola. L'interazione di IL-6 con il recettore porta all'attivazione delle Janus

chinasi(JAK) di cui la trip3 è una delle più conosciute. Le JAK a loro volta fosforilano altre chinasi, come la Stat, che quando è fosforilata(quand s unisce con Stat-P, fosfasi) arriva al nucleo inducendo la trascrizione genica. Il recettore per IL-6 è formato da due catene, attiva l'endotelio e IL-6, induce proteine di fase acuta nel fegato ed è anche un fattore di crescita dei linfociti B. Questa molecola è stata scoperta proprio perché è in grado di favorire la crescita dei linfomi AP e B, è uno dei sistemi che legano il sistema immune innato e l'immunità specifica. Insieme a TNF, IL-6 è specifica per l'attività sul fegato. TNF induce proteine di fase acuta non solo direttamente ma anche attraverso IL-6 perché questa citochina è molto specifica.

Le proteine di fase acuta sono proteine citoplasmatiche già presenti in natura ma con una concentrazione plasmatica che aumenta del 50% o più in caso di infiammazione.

Proteina	Concentrazione plasmatica (mg/dl)	Aumento osservato	Principali funzioni biologiche
Cerulo plasmina	15-60	50%	Trasporto del rame, scavenger di radicali liberi
Proteine del complemento C3 e C4	80-170	50%	Modulazione dell'infiammazione
Glicoproteina acida α_1	55-140	2-3x	Modulazione dell'infiammazione
α_1 antitripsina	200-400	2-3x	Inibizione delle proteasi
Aptoglobina	40-180	2-3x	Trasporto dell'emoglobina
Fibrinogeno	200-450	2-3x	Coagulazione
Proteina C-reattiva	< 0,5	100-1000x	Legame a microrganismi fissazione del complement Legame a cellule apoptotiche
Siero amiloide A (SAA)	< 10	100-1000x	Legame a microrganismi fissazione del complement Legame a cellule apoptotiche

La proteina C-reattiva fa parte della famiglia delle pentraxine (come la sieroamiloide A), il suo nome deriva dal fatto che lega lo *streptococco pneumoniae* facilitandone la fagocitosi. Tutte le pentraxine hanno come scopo quello di legare i batteri per facilitare la

fagocitosi, hanno struttura pentamerica.

Riassumendo:

Le citochine primarie a livello locale:

- Attivano l'endotelio, ovvero attivano le molecole di adesione;
- Attivano la chemiotassi e quindi favoriscono la formazione dell'essudato;
- Aumentano la permeabilità vasale favorendo il cambiamento del citoscheletro dell'endotelio per far passare i liquidi;
- Hanno attività citotossica(soprattutto il TNF) per distruggere i batteri o le cellule infettate da virus. (Se però l'attività citotossica è troppa possiamo avere della tossicità tissutale che distrugge il tessuto);
- Stimolazione della risposta immune specifica.

Gli effetti sistemici sono:

- La febbre, comune sia a IL-1 che a TNF;
- La sonnolenza;
- Il dolore che ha come mediatore i nocicettori, le prostaglandine(sono i mediatori più reattivi);
- Il dolore da compressione, ovvero la compressione sulle terminazioni dolorifiche da parte del liquido edematoso;
- Proteine di fase acuta, prodotte dal fegato per difesa o per supplire a delle esigenze come la chemiotassi, fagocitosi o uccidere batteri. Ad esempio, serve più fibrinogeno perché c'è più coagulazione.
- Lo shock(nei casi più gravi e più difficili da curare).

IL RIPARO TISSUTALE

A seguito della cessata infiammazione acuta avviene un processo rigenerativo. E' un processo per cui tutto torna alla normalità: l'elemento estraneo o tossico viene eliminato, i tessuti danneggiati vengono digeriti e poi ricostituiti e l'omeostasi e le funzioni dell'organo sono ristabilite.

Quando tutto questo avviene si parla di risoluzione completa in quanto la struttura e le funzioni del tessuto danneggiato vengono completamente ripristinate. In altri casi(la maggioranza), invece di una risoluzione completa si osserva un riparo: il tessuto viene riparato e le funzioni si riacquisiscono ma a seconda dell'entità del danno possiamo avere delle conseguenze che possono portare alla formazione della cicatrice o della fibrosi dell'organo oppure alla perdita di una funzione dell'organo, se il danno è molto grave.

L'esito della risposta infiammatoria acuta dipende dalla rimozione dell'essudato che deve essere riassorbito e deve essere sostituito con delle cellule rigenerate del tipo originale. Se questo non

può avvenire, come accade nel caso del tessuto cardiaco o nervoso che hanno una rigenerazione molto lenta, allora al posto del tessuto che non si può rigenerare o se le perdite sono troppo ingenti si ha la formazione della cicatrice. La cicatrice non è altro che la sostituzione del tessuto originale con del tessuto fibroso connettivo di fibre di collagene.

L'essudato è un liquido infiammatorio extra-vascolare di peso specifico superiore a 1,2 gr che contiene una grande concentrazione di proteine citoplasmatiche migrati con il liquido e cellule infiammatorie come polimorfonucleati, macrofagi o eosinofili (nel caso delle allergie). Ci sono anche detriti cellulari e batteri morti per effetto citotossico.

La presenza di essudato è sempre indice di alterazione della permeabilità vasale più o meno estesa a seconda dell'entità del danno.

L'essudato viene rimosso grazie ad enzimi proteolitici che sono in grado di idrolizzare le proteine presenti e renderle solubili per eliminarle attraverso i liquidi. Le proteasi sono liberate dalle cellule stesse dell'essudato, in particolare dai macrofagi. I fluidi vengono lentamente riassorbiti attraverso i canali linfatici che, diversamente dalle vene, hanno un endotelio più lasso che gli permette di drenare più facilmente il liquido ai linfonodi locoregionali. Questi ricevono tutti i residui (proteine digerite) ma anche gli antigeni appartenuti ai batteri presenti nell'essudato. I linfonodi svolgono il ruolo di ricevere tutte le proteine estranee formando la risposta immune.

I macrofagi digeriscono i detriti cellulari tra cui gli stessi polimorfonucleati che sono morti in loco (sono i primi ad arrivare e quindi i primi a morire) e producono anche i fattori chemiotattici e i fattori di crescita per le altre cellule che devono arrivare (i fibroblasti) per ricostituire il connettivo. I fibroblasti sono già presenti nell'interstizio, ma per effetto delle chemochine prodotte vengono reclutati nella zona infiammata e devono proliferare per produrre collagene e proteine della matrice. I fibroblasti ricostituiscono l'interstizio cellulare (il connettivo) tramite la produzione di collagene e devono ricostituire le proteine della matrice, come i peptidoglicani. Le cellule sempre implicate nel processo riparativo, oltre ai fibroblasti, sono le cellule endoteliali che devono riformare i vasi tramite un processo chiamato angiogenesi. Piastrine, globuli bianchi e linfociti intervengono nei fenomeni di coagulazione per bloccare le perdite cellulari ma anche per favorire la ricrescita. Le piastrine, se si tratta di una ferita cutanea, hanno il compito di proteggere il ricambio tissutale dagli agenti esterni.

Le cellule specifiche coinvolte nei diversi tipi di riparo sono:

- A livello di ferite cutanee, ulcere gastriche o lesioni intestinali sono le cellule epiteliali. Questi tessuti (sia la cute che le mucose) sono tessuti a rapida crescita, detti tessuti labili, perché si riproducono costantemente anche in assenza di stimolazione. Solitamente si riparano senza cicatrici, queste rimangono se è stato intaccato il derma al di sotto dell'epidermide.
- Se abbiamo dei traumi a livello cerebrale o della colonna vertebrale (tessuto neuronale), in presenza di un ictus che induca necrosi di parecchio tessuto o nel danno da

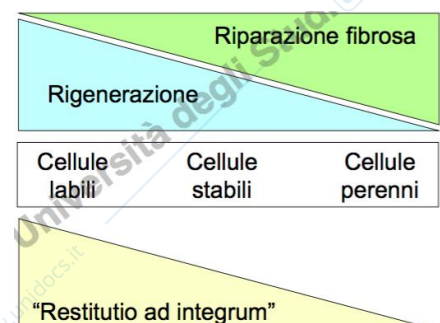
FATTORI CHE INFLUENZANO IL RIPARO

Locali:

- tipo, estensione, localizzazione del danno
- intensità e durata dello stimolo
- infezioni batteriche
- grado di vascolarizzazione/ossigenazione
- fattori meccanici quali il movimento
- corpi estranei che rimangono nella ferita

Sistemici

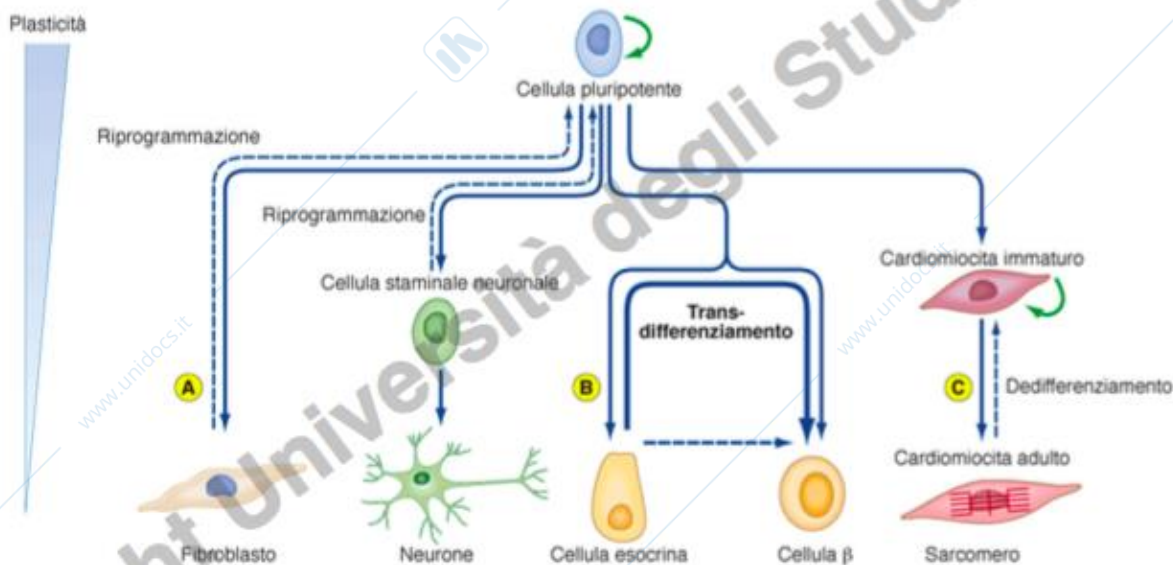
- stato cardiocircolatorio (aterosclerosi, trombosi)
- diabete
- malnutrizione
 - ipoproteinemica
 - avitaminosi (vitamina C e A)
 - mancato apporto di zinco
- età
- cachessia neoplastica
- farmaci antitumorali
- radioterapia



meningite(infezione batterica) il danno colpisce i neuroni che fanno parte dei tessuti perenni che non si replicano facilmente a causa della loro lentezza rigenerativa.

- Nell'infarto abbiamo i cardiomiociti, anche loro molto lenti a rigenerarsi;
- Nelle fratture ossee abbiamo gli osteoblasti che hanno un riparo molto funzionale;
- Nel tessuto intestinale e connettivo abbiamo l'intervento delle cellule mesenchimali che sono molto plastiche e possono rigenerare facilmente i tessuti;
- Nel fegato, gli epatociti se opportunamente stimolati possono recuperare i danni di un'epatite oppure si può ricorrere ad un trapianto di fegato che cresce e si moltiplica facilmente. Il tessuto epatico, così come quello ghiandolare, connettivo e endoteliale è detto tessuto stabile perché ha una lenta attività rigenerativa.

Nel riparo tissutale abbiamo la rigenerazione del tessuto danneggiato, se non avviene del tutto abbiamo una riparazione di tipo fibroso: le cellule necessarie devono migrare, proliferare, si differenziano e poi iniziano a sintetizzare le proteine della matrice. Il collagene della matrice appena prodotta cambia(da tipo I diventa di tipo III), abbiamo un rimodellamento della cicatrice perché il collagene assume una conformazione diversa man mano che il tempo passa. La cicatrice si consolida e occupa lo spazio dove si trovava il danno sul tessuto che non ha saputo rigenerarsi. La risoluzione completa o meno è determinata, oltre dal tipo di tessuto coinvolto, dall'entità del danno: abbiamo una *ferita a margini netti* se i margini della ferita sono vicini quindi è facile rigenerare i danni e minimizzare la grandezza della cicatrice, mentre abbiamo *un'abrasione con perdita di derma* in cui può rimanere una cicatrice perché superficialmente ricresce il derma, ma sotto il derma si riorganizza con il collagene in modo più o meno evidente. Inoltre, la cicatrizzazione è un processo molto individuale perché la capacità di produrre tanto o poco collagene e quindi di cicatrizzare bene o male è imprevedibile perché dipende dal tipo di citochine che ciascuno di noi produce e da come attiva i fibroblasti.



Le cellule staminali sono cellule che hanno mantenuto la capacità di autorinnovarsi, non sono terminalmente differenziate. Vanno incontro ad una riproduzione asimmetrica: dalla mitosi si originano due cellule figlie di cui una mantiene la capacità di autorigenerarsi mentre l'altra segue il processo differenziativo del tessuto stesso. Le staminali sono divise in staminali embrionali, tipiche della blastocisti(prime cellule che si originano dopo la fecondazione) e staminali adulte che tutti i tessuti hanno e che hanno già subito la differenziazione organo-specifica.

Le cellule staminali adulte sono ad esempio le ematopoietiche presenti nel midollo che producono globuli rossi e bianchi. Queste vengono trapiantate dopo aver eliminato il tumore oppure si fa il trapianto di midollo ontologo prelevando il midollo della persona malata, uccidendo le cellule tumorali di questa sospensione di cellule e rinoculando le cellule pure per evitare il rigetto.

Altre cellule molto usate sono i cheratinociti dello strato basale dell'epidermide che si possono coltivare in vitro(non hanno bisogno di fattori di differenziazione particolari) e riescono a

differenziarsi ricostituendo pezzi di cute. Sono in uso da qualche anno per chi ha subito ustioni gravi ed estese che gli provocano continue infezioni batteriche.

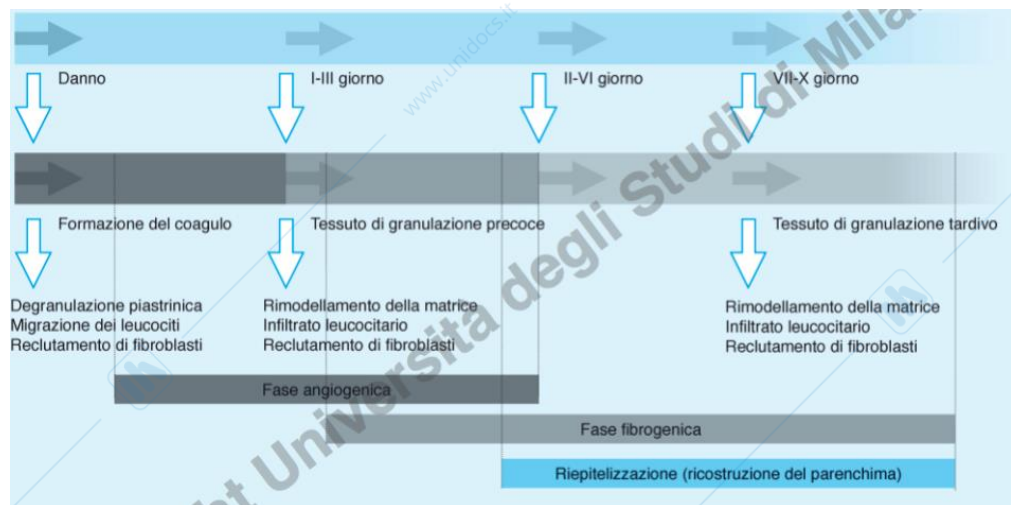
Le cellule mesenchimali sono cellule presenti nello stroma di diversi tessuti (si usa il tessuto adiposo) che possono essere differenziate con opportune citochine a condroblasti, mioblasti e osteoblasti per essere usate nel riparo di fratture e articolazioni. Sono utilizzate anche per essere riempite di farmaci antitumorali e arrivare al sito di lesione.

11/03/2016

Fasi del riparo del tessuto danneggiato:

Per una ferita cutanea di entità media solitamente dopo 10-15 gg abbiamo una risoluzione della ferita. Il primo passaggio dopo il danno è il coagulo che serve a bloccare le perdite di sangue ed isolare le zone danneggiate dall'esterno. Inizia poi la fase angiogenetica che richiama i fibroblasti, si crea il tessuto di granulazione con macrofagi che producono fattori solubili e fagocitano detriti, si forma l'essudato. C'è un riparo dei vasi e una ricostituzione della circolazione, questo è essenziale perché arrivino i costituenti. Poi successivamente, tra il secondo e terzo giorno, il tessuto di granulazione diventa tardivo: iniziano a morire cellule che hanno svolto la loro funzione e si ricostituisce la matrice. Questo termina nella fase fibrogenica, ovvero si

ricostituiscono la matrice, il connettivo e lo stroma, mentre in superficie abbiamo una riepitolizzazione in superficie che si conclude intorno al decimo giorno. Lo stesso avviene per lesioni più interne come le fiacche virali.



Il riparo della ferita cutanea, sia essa una ferita netta da taglio o con margini più separati, inizia con il coagulo entro pochi minuti. Il coagulo in superficie poi si disidrata e forma la crosta. Al di sotto inizia la fase reclutatoria di globuli bianchi, leucociti e polimorfonucleari che digeriscono patogeni e detriti cellulari.

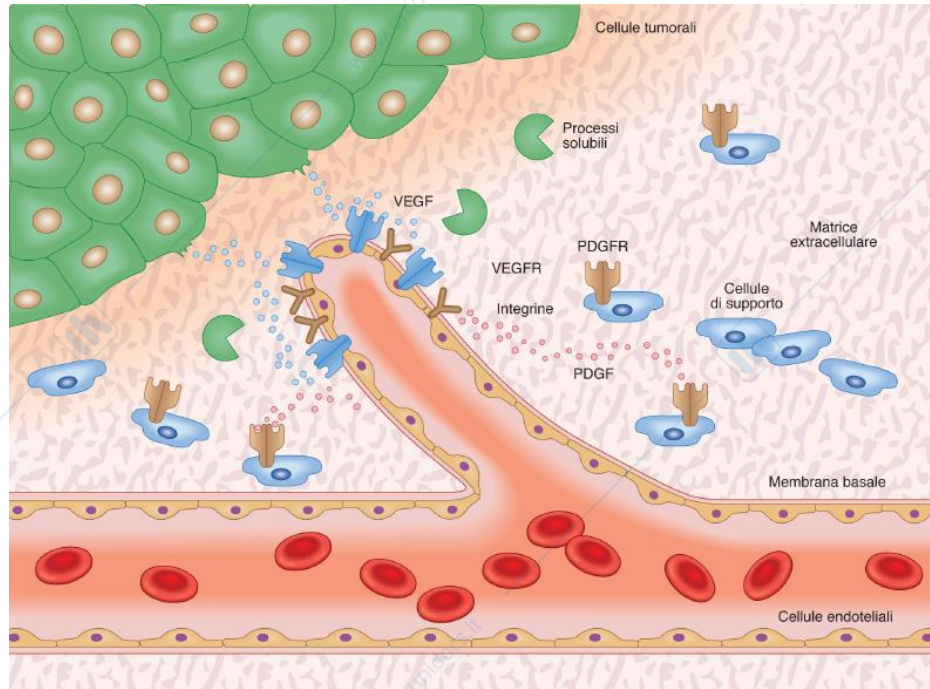
La rigenerazione dell'epidermide inizia dallo strato basale, appena al di sotto della lesione.

Dal terzo giorno ha inizio l'angiogenesi, si inizia a formare il tessuto di granulazione "fittizio" (perché fatto da cellule che non rimarranno lì) è chiamato così perché Virchow al microscopio vide i vasi appena formati come dei puntini rossi. Il tessuto di granulazione è un tessuto temporaneo che riempie l'area danneggiata per andare poi incontro a regressione. È caratterizzato dalla presenza di fibroblasti e miofibroblasti, ha il compito di creare glicosamminoglicani, depositare collagene e proteine della matrice. In questo tessuto di granulazione ha inizio l'angiogenesi. Entro una settimana, inizia la rinervazione che rigenera o ricollega le terminazioni nervose insieme alla rigenerazione dei vasi linfatici.

Nella seconda settimana, il tessuto di granulazione è sostituito da un tessuto nuovo, anche la crosta scolorisce e tornano gli annessi cutanei. Se la cicatrice è importante e profonda spesso si perdono anche gli annessi cutanei (unghie, peli e ghiandole sudoripare/mucipare).

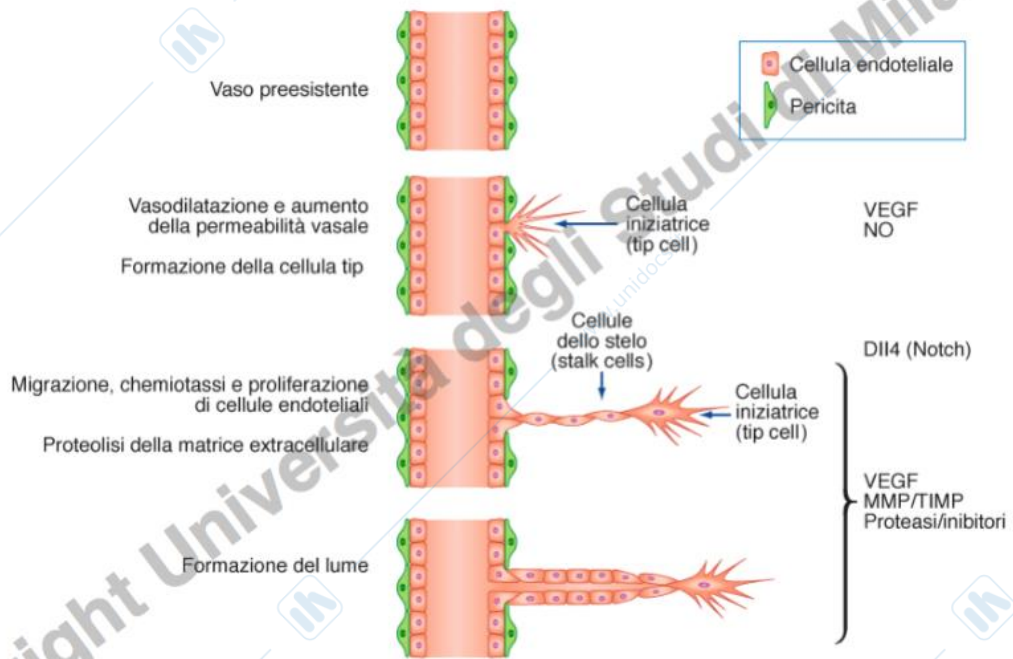
Nei mesi successivi la cicatrice matura perché cambia la composizione del collagene.

L'angiogenesi è un processo fisiologico che accompagna l'accrescimento, ha inizio dopo la vasculogenesi (genesì dal nulla, quando abbiamo solo un ammasso di cellule) a 10-15 giorni dalla fecondazione. La generazione di nuovi vasi è importante nell'accrescimento, nella ricostruzione di vasi, nell'accrescimento tumorale e nel ciclo mestruale (l'endometrio si prepara ad accogliere l'uovo).



L'angiogenesi avviene da un vaso già formato integro, non sempre vicino alla zona infiammata. Solitamente la ricrescita inizia da vasi sani (capillari). Inizia il processo angiogenetico sotto stimolazione delle citochine, la stimolazione maggiore è data da citochine e ipossia. La scarsa vascolarizzazione di una zona (ipossia) segnala nuova angiogenesi. La prima fase è la produzione di metallo-proteasi della matrice (MMPs), cioè enzimi prodotte dalle cellule endoteliali opportunamente stimolate da fattori angiogenetici che producono degli enzimi utili alle cellule endoteliali per farsi spazio nella matrice.

La matrice intorno al vaso da cui parte questo nuovo capillare deve essere degradata, sono proprio le metallo-proteasi (MMPs) a svolgere questa funzione. La cellula endoteliale inizia a



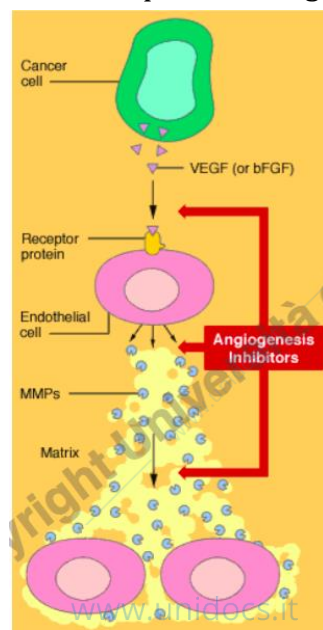
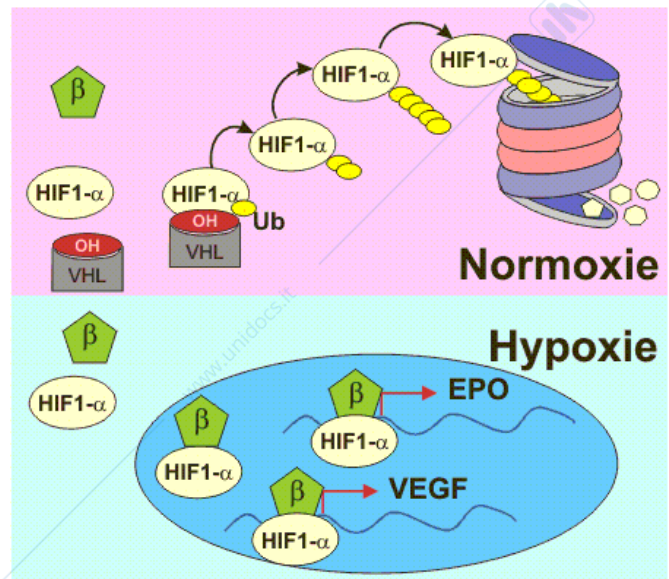
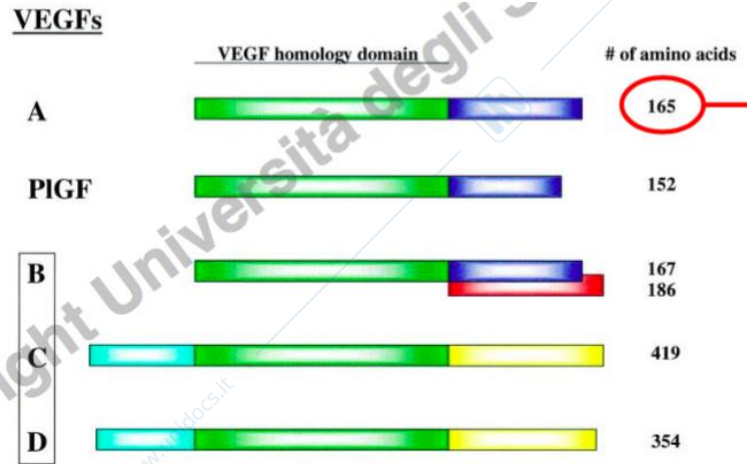
migrare per effetto dei fattori chemiotattici e a proliferare con la mitosi per ricongiungersi al vaso da cui è derivata. La prima cellula che inizia questo movimento, chiamata *tip cell*, è attivata dal VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) che è uno dei fattori di crescita degli endoteli. Questo fenomeno è anche favorito dal NO che ha dilatato i vasi, rendendo facile che si stacchi una cellula iniziatrice (*tip cell*). Vengono prodotte le MMPs della matrice, la *tip cell* si sposta in questo spazio, si divide mantenendo un legame con il vaso originario. Quando le cellule sono in quantità sufficiente, aprono un lume staccandosi finché la cellula tip che continua a spostarsi e proliferare raggiunge un altro vaso e si ricongiunge ad un altro vaso iniziando la circolazione. Tutte le cellule potenzialmente possono essere *tip cell* dipende dagli stimoli.

Alla fine del processo, le proteasi che erano state prodotte vengono inibite con la produzione di TIMP (=Tissue Inhibitor of Metal-Protesis). Il vaso ha intorno a sé cellule di muscolatura liscia, anche il nuovo vaso verrà circondato da queste cellule che ne determineranno vasodilatazione o vasocostrizione. L'angiogenesi avviene sia a livello di riparo tessutale che a livello di tessuto tumorale. In questi ultimi è molto più disorganizzata perché i segnali sono diversi e non sono ben regolati.

Gli attivatori dell'angiogenesi sono diversi, tra cui Interleuchina 8 e TNF. I più importanti sono bFGF (=basic Fibroblast Grow Factor) e VEGF, quest'ultimo è il più specifico perché in sua mancanza l'angiogenesi viene bloccata. Altre molecole attivatrici dell'angiogenesi sono la adenosina, la nicotinammide e le prostaglandine della serie E che sono derivate dall'acido arachidonico.

VEGF è una vasta famiglia che comprende proteine accumulate da un dominio omologo che è quello che si lega al recettore. Derivano da uno splicing alternativo dello stesso mRNA. Sono prodotti anche dalle cellule tumorali che decidono di produrre angiogenesi perché man mano che la massa tumorale cresce l'interno diventa sempre più ipossico. I tumori inducono anche la sintesi di recettori sulle cellule endoteliali.

Altro fattore che stimola l'angiogenesi è HIF (=Hypoxia Inducible Factor), fattore trascrizionale che è indotto nelle cellule dallo stimolo dell'ipossia ed è composto da due subunità HIF1- α e HIF1- β . HIF-1 β è sempre espresso nel citoplasma, mentre HIF-1 α viene di solito regolato dall'ossigeno. E' il sensore dei livelli d'ossigeno nel citoplasma, quando i due fattori si uniscono migrano al nucleo e vanno a legarsi a livello del DNA agli Hypoxia Responsive Elements, sequenze geniche presenti a monte di una serie di geni (in 5') che sono coinvolti nell'angiogenesi, nella captazione del glucosio nel metabolismo energetico, nell'eritropoiesi e nei geni che stimolano la



produzione di molecole di adesione. Avere degli elementi responsivi a monte di un gene (5') significa che i fattori trascrizionali si legano ai Responsive Elements e iniziano la trascrizione del DNA per quel gene. HIF è il fattore che "sente" l'ipossia e mira a risolvere il problema attivando la trascrizione di proteine che devono portare a risolvere il problema: aumenta la sintesi di VEGF, aumenta la proliferazione captando glucosio e attivando il metabolismo energetico e poi attiva l'eritropoiesi.

In normossia HIF1- α viene continuamente idrossilato ed eliminato nei proteasomi, ha quindi un metabolismo che non porta conseguenze, HIF1- β invece è la subunità costitutiva prodotta all'occorrenza. In condizioni di ipossia, i due fattori si uniscono nel citoplasma, migrano al nucleo e qui si legano a fattori responsivi dell'ipossia che si

trovano al 5' di parecchi geni. Sia il gene dell'eritropoietina che di VEGF vengono attivati perché HIF si è attivato.

Terminata la fase di angiogenesi, il tessuto di granulazione viene assorbito e i vasi si riducono, i fibroblasti muoiono. Gli inibitori dell'angiogenesi sono endogeni: i TIMP (Tissue Inhibitor of Metall-Proteolysis, angiostatina e endostatina (modificati e attualmente utilizzati in terapia). La talidomide è un farmaco usato come anti-nausea nelle donne in gravidanza, indusse però malformazione nel feto. Nell'attività antiangiogenetica è un ottimo farmaco recuperato nella terapia anti-tumorale.

La cicatrice è un tessuto neoformato che compensa le perdite di massa, sostituisce le strutture danneggiate, è costituita da collagene e proteine della matrice. La vascolatura di una cicatrice è ridotta e col passare del tempo il collagene che forma la cicatrice tende a contrarsi.

Le cicatrici viste al microscopio sono un tessuto amorfo chiaro ed avascolarizzato. Una cicatrice matura subisce *maculazione* quando si rimodella come forma e cambia l'idratazione. La

resistenza della cute riparata ha solo il 10% di quella originaria dopo una settimana dal trauma, recupera la resistenza del 70-80% in tre mesi, ma non si ha mai un recupero totale della resistenza (è meno elastica). Il recupero della zona interessata dipende dalla degradazione e dal tipo di collagene che va a costituire la matrice: il primo collagene depositato è quello di tipo III, poi si modifica a quello di tipo I che fa parecchi cross-link tra le fibre di collagene così si forma la crosta resistente ma disidratata. La cicatrice si disidrata perché i miofibroblasti si contraggono, si restringono similmente alle cellule muscolari lisce, tanto che dopo circa 6 settimane la superficie si riduce del 5-10%. Quando la cicatrice si contrae si porta dietro i legamenti e le articolazioni che legano le ossa, ciò determina un blocco dell'articolazione e impedisce la crescita dell'osso.

Le aderenze si formano come conseguenze a lungo termine di un intervento di suture, se le cicatrici riguardano il connettivo (come il peritoneo) tendono a ritirarsi. L'intestino funziona bene finché c'è movimento peristaltico, se le cicatrici bloccano questo movimento abbiamo dei problemi di funzionalità e dolori.

Ognuno di noi ha una risposta individuale differente al processo di cicatrizzazione. Se il processo è inadeguato abbiamo ulcerazione, deiscenza ed erniazione, mentre se il processo è esuberante si possono formare cisti o cicatrici ipertrofiche (dette cheloidi) oltre a problemi funzionali.

L'INFIAMMAZIONE CRONICA

Avviene perché l'infiammazione persiste nel tempo:

- L'organismo non riesce ad eliminare la causa del danno, ovvero il nostro sistema di difesa non è in grado di risolvere il problema, oppure lo stimolo persiste,
- C'è un'esposizione continua e quindi abbiamo un'alternanza continua riparazione-danno;
- C'è una persistenza di stimolo continuo derivante dall'organismo, il problema è esogeno.

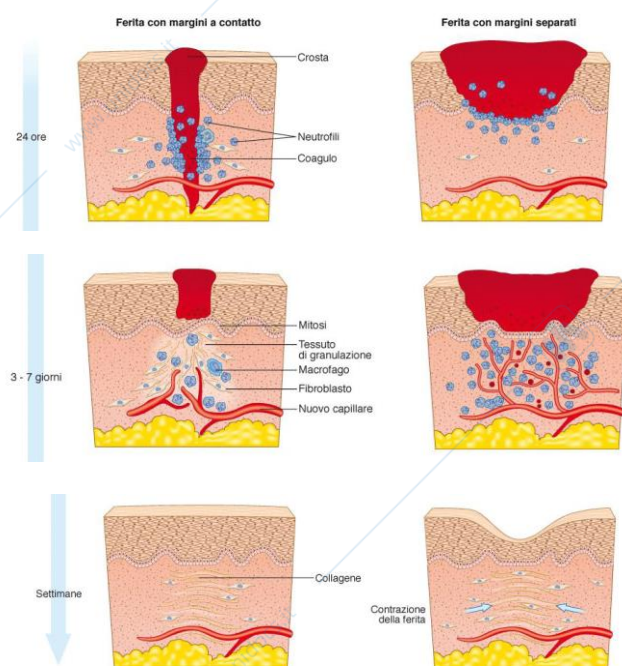


FIGURA 3-29 ► Fasi della guarigione delle ferite dermo-epidermiche con lembi giustapposti (sinistra) o separati (destra).

Fabio Colotti
Patologia Generale e Fisiopatologia
Edises

Il processo cronico è quello in cui l'infiammazione, l'attivazione della risposta e il riparo proseguono continuamente. L'infiammazione cronica è favorita da continua produzione di danno, può derivare dall'ospite, dall'ambiente che lo influenza o da un macrofago.

L'infiammazione cronica si può sviluppare subito dopo un'infiammazione acuta oppure può essere la risposta primaria ad alcuni stimoli endogeni come la tubercolosi o una malattia autoimmune.

Nell'infiammazione cronica l'infiammazione attiva, il danno ai tessuti, la risposta immune che si genera e il riparo tissutale sono contemporanei, si manifestano assieme senza mai risolversi.

Le modifiche tissutali nell'infiammazione cronica sono:

- Modifiche vascolari, c'è poco edema e una vasodilatazione minima. I sintomi sono meno evidenti di un'infiammazione acuta.
- C'è infiltrato e proliferazione di cellule che non dovrebbero esserci nell'organo interessato. In una sezione istologica di una persona con broncopolmonite cronica vediamo una presenza di macrofagi che distrugge il tessuto sottostante. I macrofagi sono le cellule più caratteristiche dell'infiammazione cronica.
- C'è la proliferazione di fibroblasti(fibrosi) che richiamano altri macrofagi. I fibroblasti producono collagene che si deposita rendendo l'organo sclerotico(irrigidito per la presenza di tessuto connettivo anziché parenchima). Se tra capillare e alveolo(negli interstizi polmonari) si forma uno strato di fibre di collagene, gli scambi gassosi sono alterati.
- Avremo sclerosi d'organo, cirrosi epatica e formazione di eventuali granulomi.
- L'angiogenesi può esserci ma non è necessaria.

Il macrofago è la cellula più importante della risposta anti infiammatoria, ha ruolo fagocitico ma anche secretorio. Produce fattori che permette alle altre cellule, come i fibroblasti, di attivarsi. Ha un ruolo profibrogenico e di rimodellamento della matrice.

L'infiltrato cronico è costituito, oltre che da macrofagi, da linfociti e plasmacellule che indicano che la risposta infiammatoria cronica è di origine immunologica. Se l'infiltrato è costituito quasi esclusivamente di polimorfonucleati l'infezione è batterica o virale, se presenta molti linfociti e plasmacellule è un infiltrato cronico, mentre se presenta eosinofili e mastociti è una reazione di tipo allergico. Lo screeping(=grattatina) della congiuntiva è l'esame delle cellule presenti sulla palpebra che ci indica la causa della reazione infiammatoria.

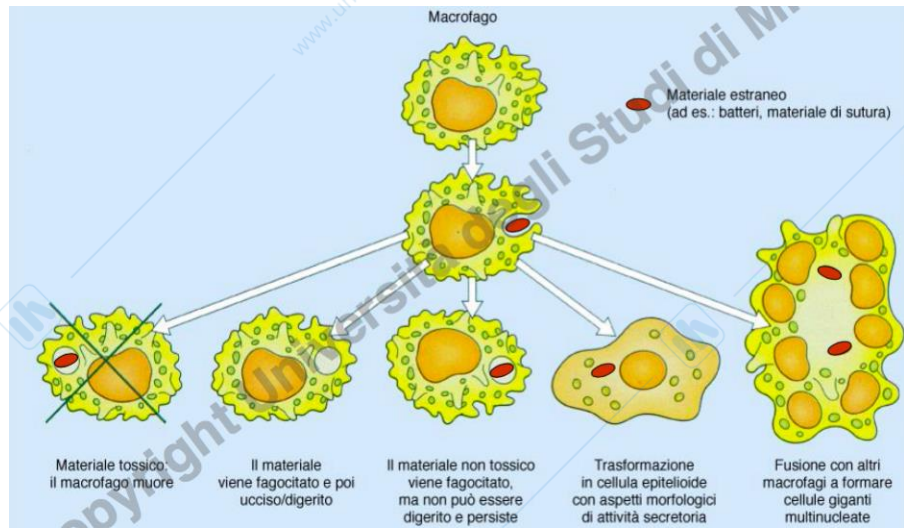
Malattie progressionali di tipo cronico sono:

- La bronchite cronica che da fibrosi polmonare risultato dall'esposizione cronica di agenti inquinanti(fumo);
- L'epatite alcolica il cui risultato a livello di fegato è la cirrosi epatica. La steatosi è il primo evento a cui consegue la cirrosi, c'è una morte delle cellule epatica con un'infiammazione. Il fegato è tra i tessuti che si possono rigenerare, ci sono dei lobuli rigenerativi e il danno prova a concludersi con una fibrosi. Il fegato cirrotico è pieno di lobuli rigenerativi perché cerca di rigenerarsi per anni. Si perde la struttura anatomica del fegato e crescono dei noduli, la circolazione nel fegato si blocca. Si crea l'*ipertensione portale* perché la vena porta non sfocia più e rimanda il sangue all'indietro.
- Le pneumocognosi sono malattie professionali dovute alle particelle di polvere(tra 1-5 μM). Queste malattie sono causa di polmoniti interstiziali in cui il danno è nello stroma dell'organo, antracosi e silicosi. I polmoni in radiografia sono normalmente scuri, nella silicosi invece li vediamo ricchi di macchie bianche di macrofagi che tentano di difendere l'organo mentre invece sono dannosi.

Se lo stimolo passa, anche l'infiammazione cronica passa con il tempo e a seconda di quanto l'organo è già stato danneggiato. In tutti i casi in cui ci sia esposizione ad agenti esterni, le infiammazioni croniche cessano al cessare dello stimolo riacquisendo le funzioni dell'organo dove ci sia ancora il tessuto (e non le placche di collagene).

La reazione granulosa avviene quando c'è un

evento estraneo o un patogeno come i micobatteri: si formano dei noduli, ovvero strutture che tentano di circoscrivere la lesione detti granulomi. Il granuloma tenta di distruggere il patogeno (o l'elemento estraneo), non ci riesce e quindi richiama altri macrofagi. Si formano le



Classificazione dei granulomi

Tipo	Agente causale	Esempi
Non immune	Corpo estraneo	Carragenina, talco, bentonite, silice
Immune	Agente infettivo	Tubercolosi, lebbra, sifilide, schistosomiasi
	Metalli	Zirconio Berillio
	Autoimmune?	Sarcoidosi

cellule del Langhans, cellule epitelioidi multinucleate che sono aggregazioni di macrofagi attivati fusi insieme. All'esterno di questi ammassi di cellule si posizionano dei fibroblasti che formano una specie di capsula fibrotica che circoscrive la lesione.

Un esempio eclatante è il batterio della tubercolosi perché ha una parete formata da cere che i macrofagi non riescono a distruggere, formando il granuloma.

I granulomi di tipo immunologico si attivano a seguito di un'infezione batterica, come tubercolosi, sifilide, lebbra e schistosoma (verme) oppure come reazioni a metalli come il berillio o lo zirconio. Altri tipi di granulomi sono quelli non immuni, ovvero dove non c'è una risposta immunologica specifica perché abbiamo sostanze amorfe come il talco, la silice e la bentonite.

La sarcoidosi è una patologia di tipo granulomatoso, non si conosce ancora l'eziologia ma si suppone una natura autoimmune perché ci sono linfociti T. Il granuloma non è di tipo caseoso, non c'è una zona di necrosi di tipo tubercolari. E' una malattia che colpisce i polmoni creando delle disfunzioni polmonari croniche con disabilità polmonare progressiva.

Il sistema dello stress di uccisione batterica ad opera dei radicali liberi dell'ossigeno: se manca nel macrofago il sistema della NADPH-ossidasi ritorniamo in una situazione di incapacità di distruggere l'elemento estraneo e quindi il granuloma si forma come conseguenza di difetto genetico anche in presenza di patogeni che normalmente sarebbero superati.



COMPARISON OF ACUTE AND CHRONIC INFLAMMATION		
FEATURE	ACUTE INFLAMMATION	CHRONIC INFLAMMATION
Onset & duration	Immediate & Transient (few days)	Delayed & weeks, months, years
Pathogenesis	Microbial pathogens, trauma, burns	Persistent acute inflammation, foreign bodies (e.g., silicone, glass), autoimmune disease, certain types of infection (e.g., tuberculosis, leprosy)

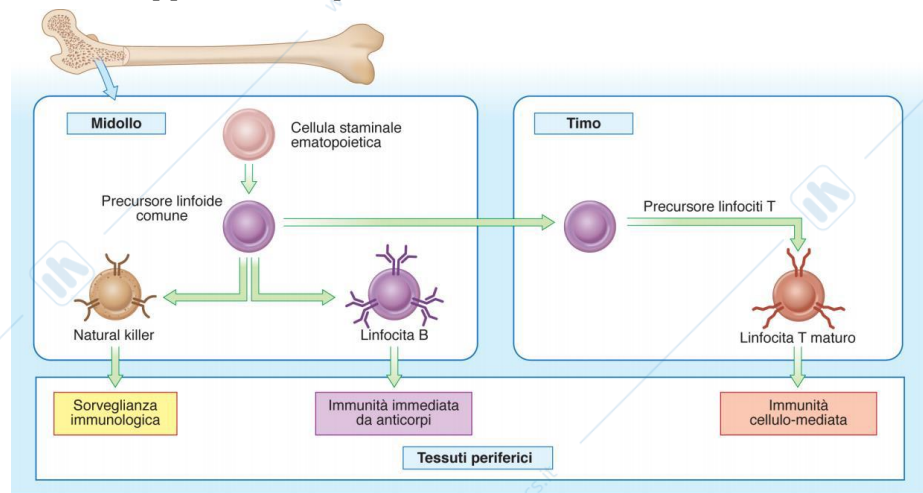
COMPARISON OF ACUTE AND CHRONIC INFLAMMATION		
FEATURE	ACUTE INFLAMMATION	CHRONIC INFLAMMATION
Primary cells	Neutrophils	Monocytes/macrophages cells), B and T lymphocytes plasma cells, fibroblasts
Necrosis	Present	Less prominent
Scar tissue	Absent	Present
Outcome	Complete resolution, progression to chronic inflammation abscess formation	Scar tissue formation disability, amyloidosis

15/03/2016

RISPOSTA IMMUNE SPECIFICA

La risposta immune specifica si attiva contro un antigene, un patogeno o una molecola, visto estraneo dall'organismo. La specificità è uno dei caratteri che fa la forza al sistema immune: nella risposta innata ci sono recettori associati ai patogeni presenti sui macrofagi, detti *toll-receptors* che danno selettività di azione e di riconoscimento, mentre nel caso della risposta immune specifica abbiamo pochi AA che vengono riconosciuti rispetto ad altri. Inoltre, la risposta immune specifica è adattiva o adattativa perché ognuno di noi a seconda dei patogeni o degli antigeni con cui viene a contatto svilupperà una risposta, si adatta all'ambiente.

Le cellule coinvolte nella risposte immune specifica sono fondamentalmente i linfociti che si differenziano in linfociti B e T e hanno la stessa origine da una cellula precursore staminale ematopoietica presente nel midollo osseo, è un precursore linfoide (non mieloide come era nella risposta immune innata).



Il precursore da origine ai linfociti B che maturano a livello del midollo osseo e poi vanno in periferia. Dallo stesso precursore linfoide nel midollo, si differenziano i precursori dei linfociti T che transitano dal midollo attraverso il timo dove si differenziano fino a diventare linfociti T maturi che poi vanno in periferia. I linfociti B prendono il nome da "borsa di Fabrizio", organo linfoide nei polli che produce linfociti B, linfociti T invece derivano da timo.

Gli organi linfoidi primari sono quelli in cui maturano i linfociti. Nell'uomo sono il midollo e il timo, quelli secondari sono periferici, in essi non avviene la differenziazione ma vengono colonizzati da linfociti maturi: la milza (polpa bianca, non la componente eritroide che è la polpa rossa che si occupa degli eritrociti), i linfonodi, il tessuto linfoide associato a diversi organi come le mucose, MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue), ai bronchi BALM (Bronchus Associated Lymphoid Tissue) e all'intestino GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). Anche le tonsille palatine e l'appendice sono considerate tessuto parte del sistema.

Il sistema linfonodale si struttura in diversi nodi disseminati in tutto l'organismo (ascellari, inguinali, cervicali) che sono raccordati tra loro da una rete di vasi sanguigni in cui scorre la linfa che ha la funzione di drenare le zone infiammate. L'edema, i liquidi, gli antigeni e le proteine solubili vengono tutti portati al linfonodo loco-regionale. Tutti i linfonodi loco-regionali si riuniscono al dotto toracico che è la parte terminale del sistema. L'endotelio dei vasi linfatici è molto più lasso, permeabile e discontinuo nella membrana basale (rispetto ai vasi sanguigni) per permettere alle proteine e alle cellule un maggior spostamento nei tessuti. Anche le prime

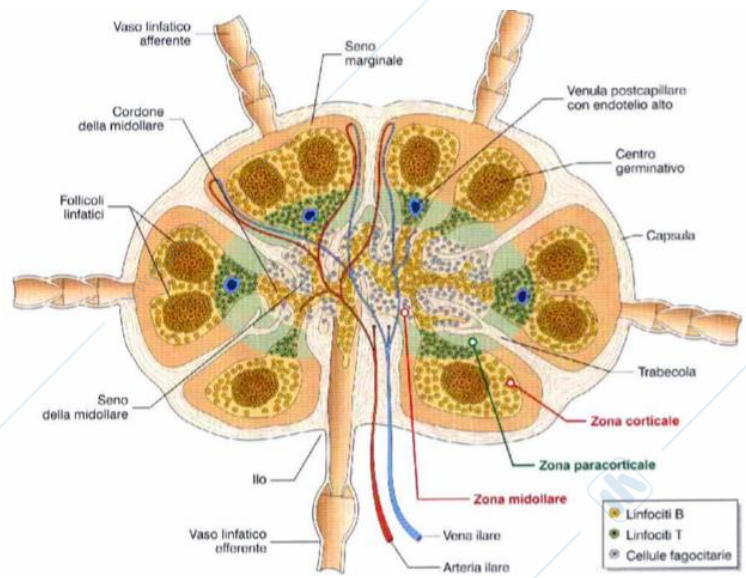
metastasi delle cellule tumorali si vanno a depositare nel linfonodo “sentinella” che è quello più vicino e drenante la zona dove si trova il focolaio del tumore.

La funzione del midollo è la linfopoiesi, ovvero la produzione continua di precursori dei globuli bianchi, questa funzione necessita di una forte attività proliferativa da parte del midollo e tutti i farmaci e trattamenti che danneggiano l'attività proliferativa del midollo (terapie citotossiche) riducono il numero dei linfociti circolanti. Oltre alla linfopoiesi, negli organi linfoidi primari avviene la c'è differenziazione da linfociti immaturi a linfociti maturi pronti a riconoscere l'antigene estraneo in periferia. I globuli bianchi nella maturazione devono acquisire due funzioni essenziali:

-**Specificità**: fare in modo che ciascun linfocita abbia un recettore specifico per l'antigene;

-**Tolleranza**: il sistema immune specifico deve essere in grado di distruggere le molecole estranee ma anche preservare il *self* (ciò che appartiene all'individuo) per preservare l'individuo. Nelle malattie autoimmuni, i linfociti riconoscono il *self* come estraneo causando la patologia.

Il linfonodo è caratterizzato da una doppia circolazione, sia da arterie che da vene. Il vaso linfatico afferente (che drena la zona circostante) arriva nella zona subcorticale portando linfociti ed antigeni. Il linfonodo poi si suddivide nella **zona subcorticale** (sotto la capsula), in una **zona paracorticale** e in una **zona midollare** (centrale) da cui parte il vaso efferente linfatico.



La zona subcorticale contiene i follicoli dei linfociti B tutti maturi ma con differenti stadi di maturazione, che inizieranno a colonizzare gli organi linfoidi secondari. Quando più linfociti B riconoscono un antigene cominciano a proliferare, quindi la zona comincia ad ingrandirsi formando un centro germinativo in cui i linfociti B si stanno moltiplicando in modo notevole. Questo si vede nei linfonodi infiammati che si gonfiano.

I linfociti T invece si stabiliscono nella zona paracorticale, essendo i mediatori dell'immunità cellulo-mediata devono prendere contatto diretto con l'antigene e uccidere le cellule che portano l'antigene. Non avremo molti linfociti T che rimangono nel linfonodo perché qui crescono e maturano ma poi si spostano nel tessuto infettato. I linfociti B non si spostano dal linfonodo perché mediano l'attività umorale (produzione di anticorpi), non hanno bisogno di spostarsi nella sede del danno ma mandano gli anticorpi che sono solubili. La zona corticale dei linfociti T è meno popolata di quanto possa esserlo la zona midollare dei linfociti B.

Nella zona midollare dipartono i seni midollari, qui troviamo tanti macrofagi e plasmacellule (linfociti B completamente differenziati che producono anticorpi). I macrofagi sono sempre presenti in quanto essenziali perché presentano l'antigene e producono citochine che una volta attivate servono ad entrambi i tipi di linfociti.

In condizioni fisiologiche, i linfociti si originano e differenziano dal midollo poi vanno in circolo e si fissano nei diversi linfonodi. Questi sono linfociti *naive* perché non hanno mai incontrato l'antigene e sono quindi “vergine” ma si dispongono nel tessuto periferico pronti ad agire. Se abbiamo un'infezione con l'invasione di antigeni estranei questi vengono drenati al linfonodo loco-regionale, qui inizia la risposta specifica: vengono attivati i linfociti B, linfociti T e i macrofagi che iniziano la risposta immunitaria. La stimolazione dei linfociti non inizia mai in circolo, tutto avviene nel linfonodo perché serve una struttura anatomica più solida perché qui i

contatti cellula-cellula e i contatti di attivazione e inibizione sono più facili. La risposta immune si localizza negli organi linfoidei secondari.

Dopo che il linfonodo si è attivato, sia gli anticorpi che i linfonodi T si distribuiscono a livello periferico nella zona infiammata per distruggere le cellule infettate da virus. C'è un continuo ricircolo di linfociti attivi, il pull di linfociti che continua a circolare da un linfonodo all'altro per garantire che questi siano sempre presenti, lo fanno specialmente i linfociti *naive* (=vergini). Ci vuole un'ora per compiere tutto il ricircolo, ovvero passare da un linfonodo all'altro, e i linfociti che circolano ogni giorno sono 25×10^9 . C'è un flusso continuo di cellule che vanno da linfonodo a linfonodo milza, alcuni stanno in circolo per più tempo e altri meno, il movimento è importante per garantire ricambio e protezione. I linfociti T circolano sia nel circolo linfatico che in quello sanguigno, anche se in quantità minori.

La risposta immune è specifica, rivolta verso molecole (solitamente proteine) capaci di generare una risposta immune, dette antigeni. All'interno di una stessa proteina riconosciamo diverse porzioni dello stesso antigene che inducono una risposta ancora più specifica, sono detti epitopi (o determinanti antigenici).

AA 18-22 (verdi) rappresentano un epitopo che sono riconosciuti da un anticorpo specifico. Gli epitopi sono di diversi tipi nella stessa molecola, non sono sempre lineari (come quelli rossi in figura) ma tutti permettono di riconoscere meglio la stessa molecola. Alcuni epitopi sono determinanti per il linfocita T (quelli di colore nero) quindi nella stessa molecola (l'antigene) ci sono più determinanti genici sia per i linfociti B (gli anticorpi) che per i linfociti T. C'è una specificità assoluta perché l'anticorpo riconosce un epitopo specifico, al massimo riconosce tutta la molecola con un'affinità più bassa rispetto al riconoscimento del singolo frammento peptidico.

L'antigene è una qualsiasi sostanza dotata di immunogenicità ovvero della capacità di indurre risposta immune quando introdotta in un essere vivente. Il sistema immune specifico è presente solo nei vertebrati, in particolare nei mammiferi è più sviluppato.

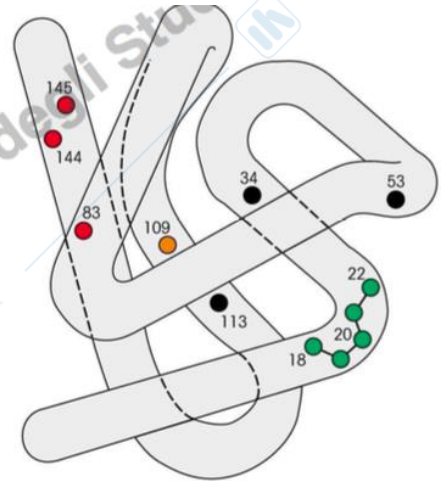
Una molecola è immunogenica e può indurre una risposta immune quando è:

- ✓ Estranea alla specie in cui viene introdotta, per essere riconosciuta come *non-self*;
- ✓ Di dimensioni adeguate, con un alto peso molecolare perché se questo fosse basso sarebbe diluita o degradata. Un ottimo immunogeno è sopra i 100000 kD;

- ✓ Deve avere una buona complessità chimica, perché il recettore dell'antigene presente sia sui linfociti T che B deve legare l'anticorpo in maniera specifica. Questo legame riconosce la struttura dell'antigene perciò il peptide linearizzato, ovvero senza ponti disolfuro, perde la reattività con gli anticorpi.

Gli anticorpi sono infatti specifici per il *loop*, senza ponti di solfuro perdiamo il riconoscimento da parte degli anticorpi.

- ✓ Deve essere somministrata con dose e via opportuna (le proteine non posso somministrarle via orale perché viene degradata dai succhi gastrici, infatti i vaccini che sono proteine associate ai patogeni devono essere dati per via parenterale - tranne il vaccino Sebin);
- ✓ Dipende dalle caratteristiche genetiche dell'animale trattato, ci sono differenze anche da individui a individui della stessa specie (come accade ad esempio nelle allergie).



alla

Gli

	LYSOZYME	ISOLATED LOOP PEPTIDE	REDUCED LOOP PEPTIDE
Anti-lysozyme	++	+	-
Anti-loop peptide	+	++	-

La risposta immune si sviluppa in più fasi:

Riconoscimento specifico dell'antigene: avremo il contatto con l'antigene nuovo X.

Nella cellula sono presenti anche i linfociti *naïve* specifici per l'antigene X, dei linfociti T e B. I linfociti B riconoscono e legano con i recettori l'antigene X attivandosi. Si attivano anche i linfociti T.

Attivazione: espansione clonale dei linfociti. Le poche cellule specifiche per l'antigene che si trovano nel pull di linfociti che stanno

ricircolando. Si stima che

abbiamo circa 500mila linfociti capaci di rispondere ad un batterio o virus. E' necessario che proliferino e si differenzino diventando cellule effettrici: i linfociti B diventano plasmacellule(modificano dimensione e forma) e iniziano a secernere anticorpi, mentre i linfociti T diventano cellule citotossiche o cellule che producono citochine(linfociti T-helper) portando la risposta ad essere compiuta e amplificata al massimo.

La curva temporale degli anticorpi sale vorticosamente nella fase di espansione, fino ad una risposta massima intorno al 14°giorno. L'antigene può essere eliminato quando il massimo della risposta è stato raggiunto. Avviene sia da parte umorale("umor"= liquidi biologici) sia quella cellulo-mediata dai linfociti T e dai macrofagi attivati dai linfociti T. L'immunità cellulare coinvolge cellule volte ad eliminare altre cellule.

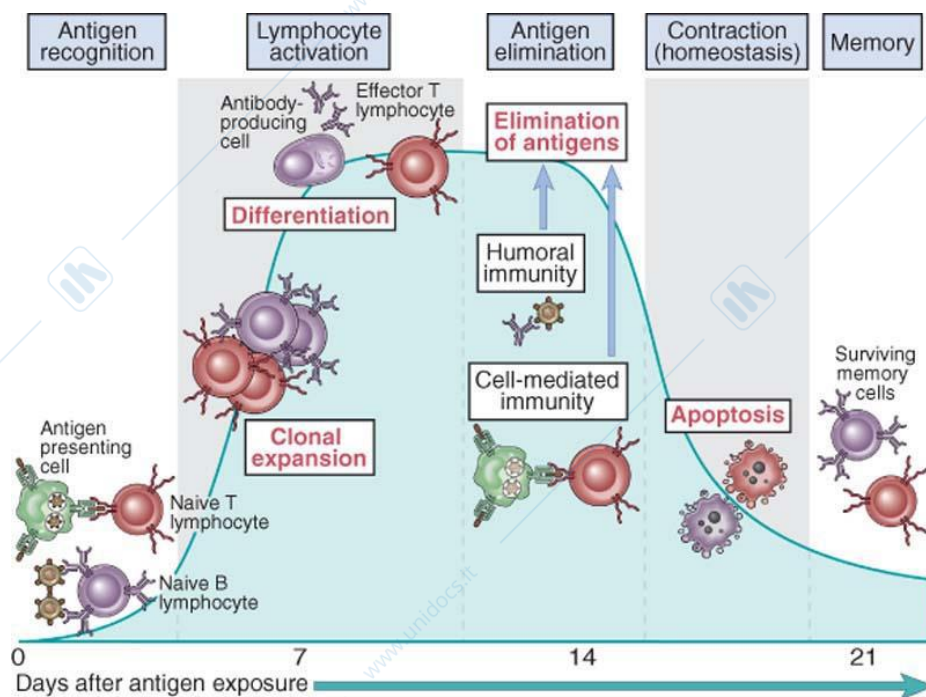
L'eliminazione dell'antigene: cala la concentrazione degli anticorpi non appena l'antigene è stato eliminato. Molti linfociti attivati vanno a morire per apoptosi, rimangono in vita le cellule della memoria anche per molto tempo.

Questi linfociti potranno essere riattivati in seguito e in modo più efficiente al contatto con lo stesso antigene. Anche le cellule della memoria mantengono la specificità.

La curva degli anticorpi è diversa da zero: all'inizio non avevamo alcun anticorpo e quindi era a zero ma alla fine oltre alle cellule di memoria abbiamo una concentrazione di anticorpi per quell'antigene. Dosando questi anticorpi sappiamo se siamo stati vaccinati(immunizzati) o no per quell'antigene. Se da piccoli siamo stati vaccinati, anche dopo 20 anni abbiamo gli anticorpi circolanti. Gli stessi anticorpi si ritrovano se abbiamo combattuto la patologia. La concentrazione degli anticorpi dopo una risposta primaria è bassa, dopo la seconda\terza volta che siamo stati colpiti da quella stessa patologia aumenta notevolmente.

Caratteristiche della risposta antigenica:

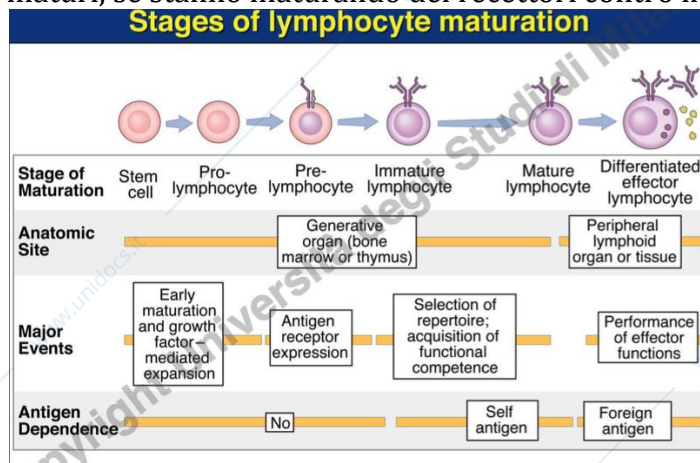
- La diversità: il sistema immune può riconoscere 10^9 antigeni(determinanti) distinti con specifici recettori.
- La memoria: il sistema immune una volta riconosciuto l'antigene è in grado di rispondere più velocemente e più efficacemente ad un antigene dopo la seconda esposizione e tutte le esposizioni successive saranno ancora più efficienti e veloci. I linfociti di memoria si replicano piano, rimangono confinati in zone del midollo o di organi periferici e rimangono lì



per molto tempo (anche 20 anni). Il fatto di averne sempre a disposizione ci protegge con l'avanzare dell'età.

- L'autoregolazione: il sistema immune si autoregola dopo aver eliminato l'antigene. Questo è il suo dovere principale, è il motivo per cui le malattie autoimmuni sono così pericolose. In condizioni normali c'è autoregolazione, eliminato l'antigene il sistema si blocca.
- La tolleranza: capacità dell'antigene di salvaguardare il self.

L'acquisizione della specificità avviene nella fase midollare per i linfociti B, nel timo per i linfociti T. Il processo di maturazione del recettore avviene negli organi linfoidi primari e con esso la tolleranza: dalla cellula staminale i linfociti maturano in diversi stadi fino ad arrivare a linfociti maturi, se stanno maturando dei recettori contro il self arrivano dei segnali negativi.

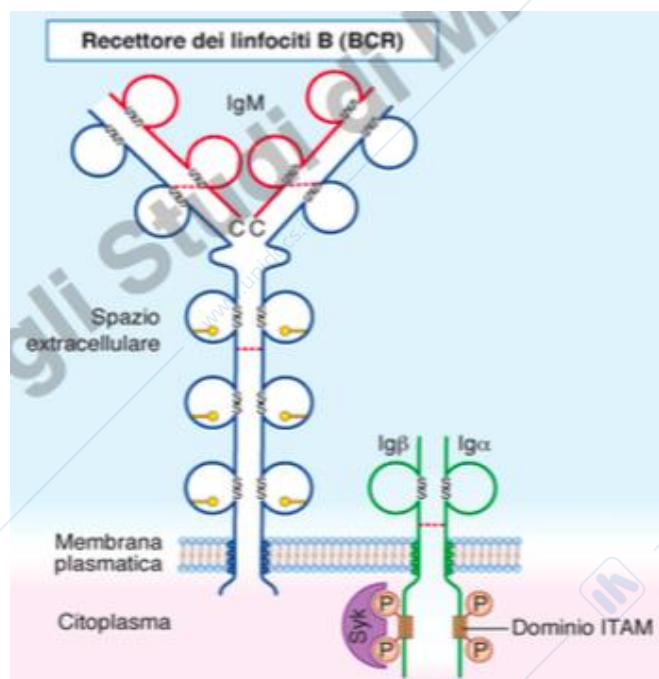


Inizia l'espressione dei recettori di superficie che vengono selezionati perché nel timo o nel midollo avviene l'induzione di tolleranza, oltre a sviluppare specificità. Fino al 1960 la funzione dei linfociti era sconosciuta finché non sono stati messi in vitro in presenza di uno stimolo e si è capito che davano luogo a plasmacellule e anticorpi. Da allora si è incominciato a studiare l'attività dei linfociti. Sia i linfociti T che B hanno sulla superficie dei recettori: BCR(=B cell receptor) è un anticorpo di classe IgM e TCR, un eterodimero di

membrana formato da due molecole della famiglia delle immunoglobuline. Il sistema di generazione della diversità dei recettori è simile nei due gruppi.

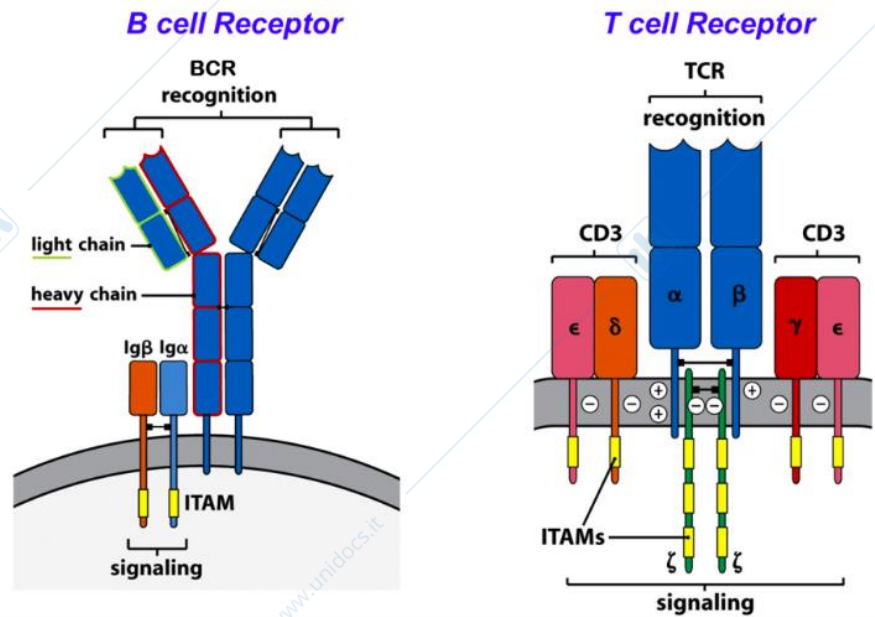
Le immunoglobuline sono caratterizzate da domini immunoglobulinici di 110-115 AA con due cisteine che gli fanno assumere forma globulare.

Il recettore dei linfociti B è un anticorpo con due catene pesanti (in rosso) e due leggere (in blu). Una volta attivati gli anticorpi sono secreti e diventano solubili. I domini immunoglobulinici sono quelli che legano l'antigene, quindi il recettore dei linfociti B lega l'antigene con i due domini N-terminali della catena leggera e di quella pesante. I due domini hanno la lettera V(=variabile), nella specie umana tutti i linfociti B hanno recettori che differiscono solo per questa zona. Per ogni anticorpo abbiamo due siti di legame per l'antigene che sono i due domini variabili.

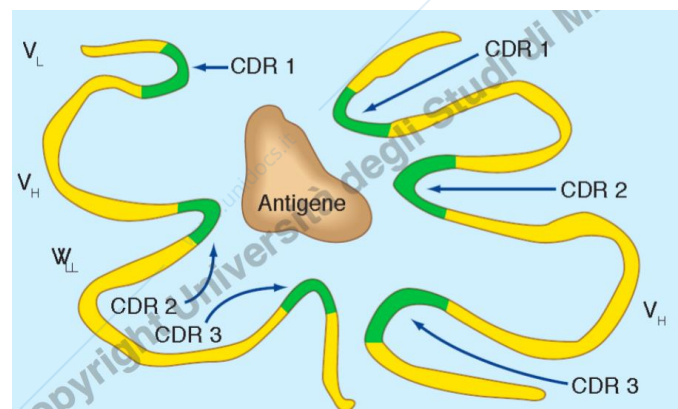


Il recettore dei linfociti T è un eterodimero della stessa famiglia dei linfociti B (si vede il caratteristico dominio immunoglobulinico), una molecola transmembrana con una catena α e una β con due domini per ciascuna catena: uno costante e uno variabile. I due domini variabili, anche questi N-terminale, sono quelli che determinano il sito di legame per l'antigene e che rendono i linfociti uno diverso dall'altro. Le porzioni variabili danno la differenza, infatti a livello genico avremo un linfocita con un recettore complementare all'antigene che sarà selezionato dall'antigene. La natura produce milioni di linfociti tutti diversi tra di loro, la selezione viene fatta dall'antigene.

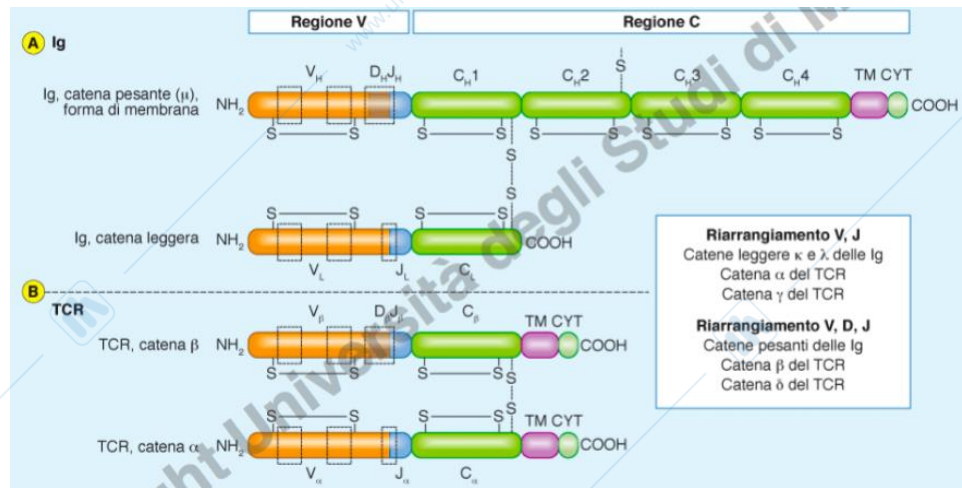
La teoria della selezione clonale (Frank Macfarlane Burnet, 1957) venne teorizzata prima ancora che si conoscessero le funzioni dei linfociti. Oggi sappiamo che la selezione clonale è diretta e stimolata dall'antigene e sappiamo che ciascun linfocita ha un recettore diverso. Solo il recettore che lega un antigene particolare viene selezionato, c'è espansione clonale: il clone responsivo si attiva, si differenzia a plasmacellula e poi a linfocita per portare alla proliferazione finale con la risposta. I linfociti hanno ciascuno un recettore diverso e sono scelti da un antigene diverso, se non vengono scelti perché durante la semi-vita l'antigene specifico non compare vanno a morire e se ne generano di nuovi.



Nei recettori B, quando viene occupato il sito di legame con l'antigene si attiva il recettore ma la molecola non possiede una coda citoplasmatica abbastanza lunga da prendere contatto con domini chinasi e citoplasmatici (che poi trasmettono il segnale). Accanto ad ogni recettore dei linfociti B si trova un altro complesso che si chiama immunoglobulina α e β che serve a trasmettere il segnale. α e β sono sempre associati, non sono variabili. Anche il recettore dei linfociti T ha due domini α e β che si associano ad un complesso CD3 che trasmette il segnale. LH sta per light chain, HC sta per heavy chain. L'antigene prende contatto in sei punti (zone verdi), 3 per la regione variabile e 3 per quella pesante, che sono zone CDR (=complementarity determining regions) regioni che determinano la complementarità legando direttamente l'antigene.



La diversificazione della porzione variabile dei recettori avviene per un processo genetico chiamato ricombinazione somatica o riarrangiamento di segmenti genici che codificano per le regioni variabili del BCR o TCR. Gli AA della regione variabile



non vengono codificati da un unico gene, linearizzando le due molecole vediamo la regione costante: nella catena pesante una porzione C-terminale citoplasmatica, quella transmembrana e 4 domini costanti, mentre nella catena leggera abbiamo un dominio variabile oltre al dominio costante (color verde). I domini costanti vengono codificati da altrettanti esoni mentre il dominio variabile sia della catena pesante che di quella leggera viene codificato da segmenti diversi di DNA. I colori della figura indicano porzioni diverse di DNA di cui abbiamo copie multiple nel genoma. V per *variable*, D per *diversity* e J per *joining*. A livello del DNA somatico (proprio di tutte le cellule), non del linfocita B, nei geni che codificano per questa regione abbiamo dei piccoli segmenti multipli simili tra di loro ma diversi (tanti segmenti V, D e J) che quando avviene la differenziazione dei linfociti B vengono selezionati uno per volta a formare la catena variabile del recettore di quel linfocita.

Tutto il resto del DNA di queste sequenze si perde. Se andiamo a confrontare il *DNA germ line*, ovvero quello di tutte le nostre cellule eccetto i linfociti B, ci rendiamo conto che questa porzione del genoma è più lunga. Il sistema enzimatico delle *recombinasi* fa sì che per ciascun linfocita B durante la maturazione abbia la catena variabile riarrangiata. Avremo tre segmenti presi a caso che vanno a formare questi 110-115 AA. Nella catena leggera abbiamo solo due segmenti che si riarrangiano (V e J), non sono gli stessi della catena pesante perché si trovano su un cromosoma diverso ma anche questi sono su coppia multipla.

Meccanismi simili riguardano i linfociti T e si ritrovano nella diversificazione della zona variabile del *T cell receptor*. I riarrangiamenti avvengono solo nei linfociti T, non nei B.

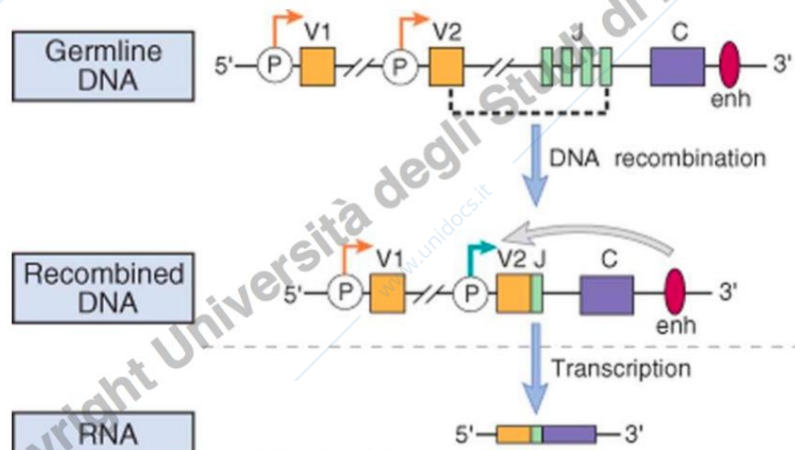
Il DNA della linea germinativa (*DNA germ line*) possiede non solo i loci per le porzioni costanti (color celeste) ma anche 6 segmenti J (color verde) nella catena pesante, 23 segmenti D e 200 segmenti V.

Nel DNA ricombinato si perdono dei segmenti, fino ad arrivare al trascritto primario. Lo stesso accade per la catena leggera, cambiano solo i geni. Alla fine l'anticorpo è diversificato perché i due geni sono diversi.

La diversità combinatoria degli anticorpi deriva dalla combinazione di segmenti diversi di V, D e J unica per quel recettore e quel linfocita. Inoltre, la diversità combinatoria è aumentata dalla giustapposizione di regioni variabili casualmente generate e c'è anche una diversità funzionale perché il sistema di riarrangiamento è di tipo enzimatico, detto *recombinasi*.

Le endonucleasi tagliano il segmento, dei sistemi si occupano del riconoscimento e

Ricombinazione genetica nel recettore dei linfociti



le ligasi riformano il DNA. Questo sistema se alterato è responsabile di patologie di immunodeficienza severa combinata che impedisce la differenziazione dei recettori. Nascono bambini il cui sistema enzimatico non funziona bene, non hanno né linfociti B né T per riconoscere gli antigeni. Il funzionamento impreciso delle endonucleasi e ligasi fa sì che a livello delle giunzioni si creino delle delezioni che generano nuove triplette o delle addizioni che aggiungono nucleotidi legati ai segmenti.

Le stime dicono che il numero di possibili combinazioni V, D e J possono essere fino a 250 mila, meno nel *T cell receptor*. La diversificazione giunzionale da parecchia variabilità, possiamo avere circa 10^{11} recettori diversi per le immunoglobuline e 10^{16} per i linfociti T. Ben al di sopra di quanto ne abbiamo bisogno. Se andiamo a fare l'analisi del DNA di un linfocita T troviamo riarrangiata (o più corta) la regione che codifica per il linfocita T ma sarà normale la regione che codifica per i linfociti B perché sono tessuti specifici.

L'IMMUNITÀ ACQUISITA (o specifica)

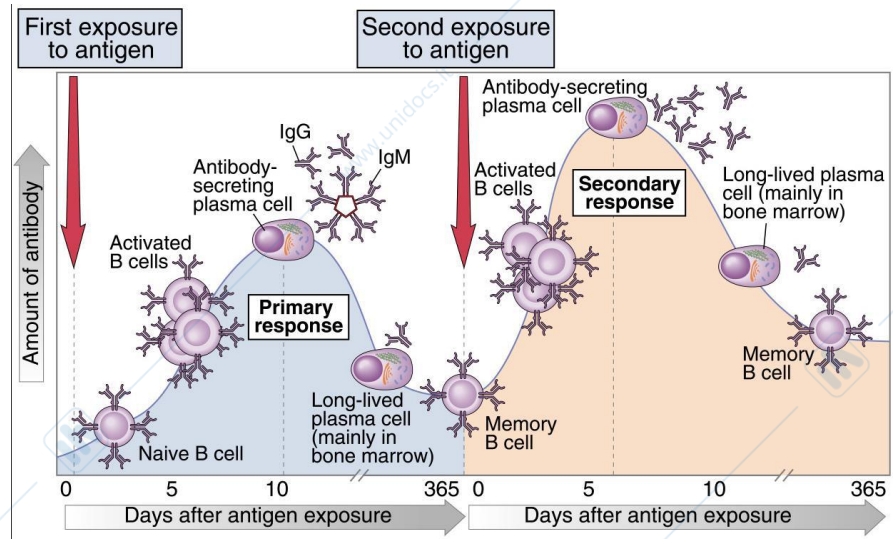
La risposta anticorpale è la produzione di anticorpi contro un determinato antigene. Le popolazioni in gioco sono i linfociti B che si ritrovano nei linfonodi quando è già avvenuta la fase di differenziazione, hanno già il recettore e quindi possono iniziare la loro azione. Le cellule una volta attivate si chiamano plasmacellule perché secernono anticorpi di diversi isotipi.

Nella fase di maturazione

midollare c'è un'importante proliferazione, si esprime il sistema enzimatico RAG (recombinasi) che compare nello sviluppo da pro-linfocita B a maturo. Fino allo stadio di pre-B il DNA è nella forma di *germ line* mentre subito dopo le recombinasi compare il primo riarrangiamento V, D e J della catena pesante. Dopo di quello compare il riarrangiamento della catena leggera, poi lo *splicing* alternativo e la formazione del recettore maturo. Se durante la maturazione il riarrangiamento non matura bene, si presenta già un segnale di stop: il linfocita muore per apoptosi e non si evolve. Se andiamo a fare il fenotipo, ovvero a vedere con degli anticorpi quali sono le molecole espresse dai linfociti B in questa fase, vedremo che le catene pesanti della classe *new M* sono prima citoplasmatiche e poi appaiono in superficie, in seguito compare la catena leggera e nello stato immaturo abbiamo tutta la IgM di membrana che possiamo identificare.

Il motivo per cui conosciamo così bene questa maturazione è che nelle leucemie a cellule B (tumori che colpiscono diversi stadi di maturazione dei linfociti B) il marcatore è essenziale per identificare il tipo di leucemia. Ci sono diverse leucemie a cellule B che sono caratterizzate dall'esprimere uno o più marcatori di differenziazione. Il B220 è uno dei marcatori più comuni che caratterizza lo stato immaturo ed è un bersaglio per gli anticorpi monoclonali usati in terapia per uccidere le cellule tumorali. Compare nella fase pre-B ma rimane anche in periferia. Quando il linfocita B è maturo esprime ad alto livello le IgM di superficie (il recettore).

Se nel sangue periferico si vogliono dosare i linfociti B si fa un'immunofluorescenza con anticorpi anti-IgM perché queste Ig di superficie sono caratteristiche del linfocita B maturo.



Gli anticorpi: LINFOCITI B

I linfociti B non funzionano finché non sono maturi ovvero finché non arrivano negli organi linfoidi periferici. La maturazione coincide con la presenza del recettore, un'immunoglobulina di tipo M. I linfociti B stanno nei linfonodi ma anche negli organi linfoidi secondari e aspettano che arrivi l'antigene. Una volta attivati diventano plasmacellule e producono anticorpi.

Le catene leggere e pesanti hanno siti N-terminali variabili che legano l'antigene. La regione al centro si chiama "regione cerniera" perché è caratterizzata da due ponti di solfuri formati da 4 cisteine. Con la papaina (enzima proteolitico) si digeriscono gli anticorpi, si staccano due frammenti chiamati Fc (frammento cristallizzabile, la porzione costante delle due catene pesanti), mentre rimangono isolati i frammenti FAB (*Fragment Antigen Binding*) che possiede i due siti variabili.

La digestione con tripsina può separare ulteriormente le due catene, si parla allora di FAB isolati.

L'anticorpo quando viene usato in terapia può essere indotto soltanto da una specie diversa. Tutta la porzione Fc del cavallo, usato per il vaccino anti-tetanico, è fortemente immunogenica per l'uomo. Per evitare la malattia da siero, si utilizza solo la porzione Fab che non ha questa reattività e delle cross-reattività.

Oggi con la possibilità di avere anticorpi monoclonali e ingegnerizzati, questo problema è superato. Sulla base della struttura della catena pesante è possibile identificare 7 isotipi o classi della specie umana:

Il peso molecolare è variabile (circa 50 kD) le due catene leggere sono sempre uguali per uno stesso anticorpo, possono essere o di classe kappa o di classe lambda. Anche queste due porzioni vanno incontro a riarrangiamento. Il peso molecolare totale di un anticorpo è intorno ai 150 kD. Le porzioni N-terminali hanno specificità perché riconoscono l'antigene, mentre la porzione costante riconosce ed è legata dai macrofagi (*Fc receptor*). In questa zona si trova il sito di legame per il complemento (proteine plasmatiche che fanno funzionare l'anticorpo come molecola citotossica). L'anticorpo da solo non è citotossico, per esercitare un'attività deve legarsi ai macrofagi, alle cellule *natural-killer* o al complemento. La porzione cristallizzabile (Fc) è quella effettore di un anticorpo, mentre la porzione N-terminale è quella che dà specificità.

Quando sono solubili, le IgG e IgE rimangono monomeriche anche quando vengono secrete. La differenza sta nel fatto che IgE ha tre domini nel frammento cristallizzabile (pesante) mentre le IgG ne hanno solo due. Tutte le classi di IgG hanno la stessa struttura.

Le IgM, che sono le molecole che funzionano da recettori sulla superficie dei linfociti B e quindi sono monomeriche, quando vengono secrete diventano pentameriche. Ci sono 5 diverse singole molecole anticorpali di IgM e al centro una catena J (*joining chain*) che riesce a legare dieci unità di antigene, due per ogni molecola, quindi ha una forte reattività e blocca l'infezione molto velocemente. Le IgM solo quelle che vengono prodotte per prime in ogni risposta immune primaria perché hanno questa grossa capacità di legare quanto più possibile antigene nel più breve tempo possibile.

Le IgM solo quelle che vengono prodotte per prime in ogni risposta immune primaria perché hanno questa grossa capacità di legare quanto più possibile antigene nel più breve tempo possibile.

2 Catene leggere (~25 kDa)

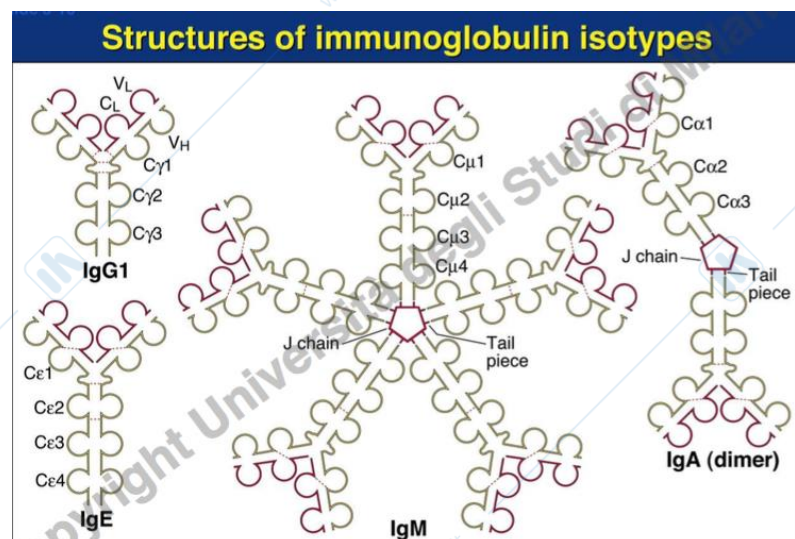
2 classi: -κ
-λ

Non hanno differenze funzionali

2 Catene pesanti (~50 kDa)

7 classi: - μ Ig M
- α Ig A
- δ Ig D
- γ1, γ2, γ3 Ig G1, IgG2, IgG3
- ε Ig E

La regione costante determina i diversi isotipi



Le IgA sono dei dimeri uniti da una catena J, la loro distribuzione nel siero è più bassa ma si ritrovano a livello delle secrezioni e delle mucose (bronchiale, intestinale, nel latte, etc).

Le IgG sono quelle monomeriche e più abbondanti nel plasma, sono quelle utili per il fenomeno di opsonizzazione (opsonizzare = ricoprire), ovvero sono capaci di legare antigene e macrofago per far sì che il patogeno venga fagocitato. Essendo di basso peso molecolare sono capaci di passare attraverso la placenta e consentono al feto di essere protetto durante la gravidanza, rimangono fino a 5-6 mesi dopo la nascita. La citotossicità cellulare delle IgG è mediata da anticorpi.

Le IgM sono pentameriche, più voluminose, non le troviamo nel neonato a meno che non venga infettato da un virus o batterio poco dopo la nascita. Le IgM ci permettono di dire se la patologia che il neonato sta combattendo deriva dalla madre o dal feto stesso. Una risposta immune primaria vede di prevalenza IgM piuttosto che IgG, se queste sono presenti la risposta immune può essere pregressa, non necessariamente attuale.

TABELLA 4-4 ▶ Principali proprietà biologiche delle immunoglobuline umane

Isotipo anticorpale	Sottotipo (catena H)	Concentrazione nel siero (mg/mL) ^a	Emivita nel siero (giorni)	% delle Ig totali	Distribuzione intravascolare (%) ^b	Forma secreta	Funzioni effettrici
IgA	IgA1,2 (α1 o β2)	3,5	6	13	42	Monomero, dimeri, trimero	Immunità mucosale: secrezione di IgA nell'intestino e nei bronchi Immunità neonatale: trasferimento di IgA materne dal latte all'intestino del neonato
IgD	Nessuno (δ)	Tracce	3	<1	75	Nessuna	Recettore per l'antigene dei linfociti B naive (solo in membrana)
IgE	Nessuno (ε)	0,05	2	<0,01	50	Monomero	Citotossicità cellulare mediata da IgE ed eosinofili Degranolazione dei mastociti (ipersensibilità immediata)
IgG	IgG1-4 (γ1, γ2, γ3 o γ4)	13,5	23	80	45	Monomero	Opsonizzazione, attivazione della via classica del complemento, citotossicità cellulare mediata da anticorpi e cellule NK o macrofagi (ADCC) Immunità neonatale: gli anticorpi materni attraversano la placenta
IgM	Nessuno (μ)	1,5	5	6	80	Pentamero	Recettore per l'antigene dei linfociti B naive, attivazione della via classica del complemento

^a Si tratta di valori medi; la variabilità è molto ampia.

^b Percentuale nel siero rispetto al totale nell'organismo.

Le IgA sono importanti per l'immunità mucosale e nelle secrezioni, nell'immunità neonatale perché vengono trasferite attraverso il latte materno. Le IgA si ritrovano nei bronchi, rispondono ai patogeni ambientali inalati dall'esterno. Le IgA sono importanti anche nella celiachia (malattia autoimmune con lesioni intestinali).

Le IgE sono presenti nelle malattie allergiche, il loro Fc lega i mastociti (non ai macrofagi) che contengono istamina e la liberano. L'evento è immediato dopo l'esposizione all'allergene, le IgE legando i mastociti ne causano la degranolazione. Le IgD non sono solubili, la maggior parte rimane legata alla superficie cellulare (come le IgM che però vengono secrete come pentameriche) e di solito si ritrovano nelle cellule di memoria oltre che nei linfociti B naive.

La semi-vita nel siero è differente per ogni sierotipo, le IgE ad esempio permangono pochi giorni (< 2gg). Dosare le IgE nel siero ci dice se il soggetto è allergico o no perché nel soggetto allergico sono fortemente presenti rispetto al normale, salgono nella fase di tipizzazione di un'allergia. Le IgG sono le più abbondanti nel siero e hanno semi-vita di 23 giorni, sono quelli che ci proteggono più a lungo.

L'evoluzione della risposta anticorpale

I linfociti B possono legare gli antigeni direttamente (legano l'antigene nativo così come la proteina viene prodotta dal patogeno o espressa sulla sua superficie), mentre i linfociti T hanno bisogno di una processazione delle proteine. I linfociti B devono assolutamente proliferare perché la loro frequenza è bassa, differenziarsi, diventare plasmacellule e produrre anticorpi: all'inizio vengono prodotte IgM pentameriche, anche a bassa affinità con l'antigene tanto sono comunque capaci di bloccare quanti più antigeni possibili.

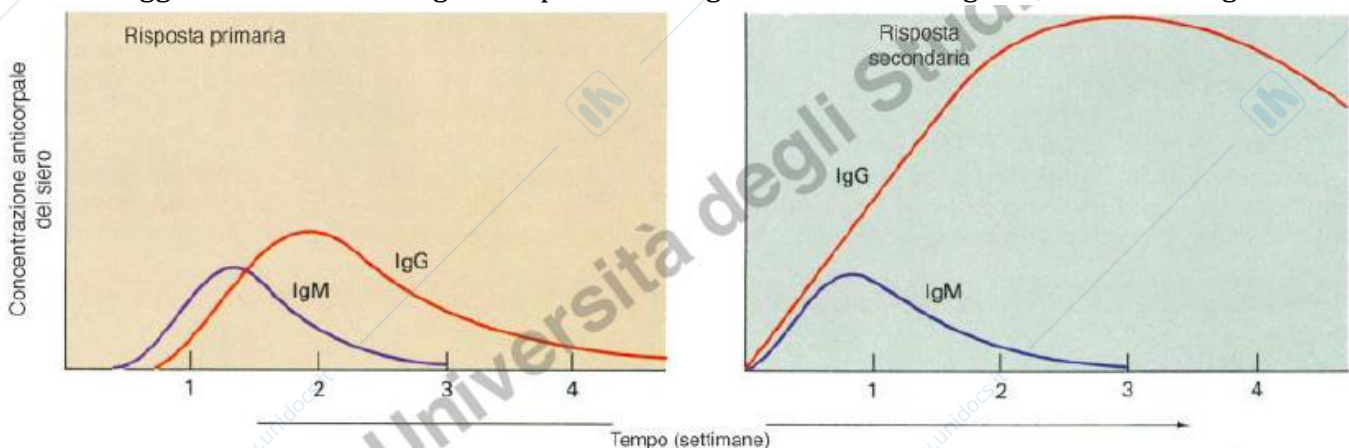
Dopo le IgM, vengono prodotte immunoglobuline di classi diverse: questo processo si chiama *switch isotipico* (cambiamento di classe) perché lo stesso clone di linfociti B per i segnali che arrivano dalle citochine presenti nell'ambiente, decide di cambiare classe di anticorpi. Solitamente sono le IgG ad essere indotte da un antigene, ma se ad esempio abbiamo un allergene lo *switch isotipico* porta alla IgE. Quindi prima di producono sempre le IgM e poi la risposta si adatta, producendo IgG o IgE. Se un antigene è distribuito nelle mucose produce IgA, sempre dopo le IgM. C'è il cambiamento di classe perché la risposta deve essere ad alta affinità, l'antigene induce una risposta più adatta ad eliminarlo.

Eliminato l'antigene la risposta primaria decade, rimangono vive le plasmacellule a lunga vita (già differenziate che continueranno a produrre anticorpi stimolate ogni tanto dall'antigene) e i linfociti B di memoria (cellule non in attiva proliferazione, non sarebbe necessario). Questi linfociti sono stati selezionati dall'antigene, esprimono l'antigene per riconoscerlo. La risposta secondaria ha lo stesso antigene, ad esempio lo stesso allergene o virus influenzale.

Caratteristica	Risposta Primaria	Risposta Secondaria
Cinetica	Lenta (5-10 gg)	Veloce (1-3 gg)
Frequenza ly B specifici	10^4-10^5	10^3
Isotipo	IgM > IgG	IgG, IgA
Affinità	Bassa	Alta
Ipermutazione somatica	Bassa	Alta

Quando l'antigene viene a contatto con la cellula di memoria questa viene attivata, va incontro a un periodo di proliferazione che però è più breve rispetto alla proliferazione come risposta primaria. La riduzione di plasmacellule è più veloce e si raggiunge prima il picco della concentrazione anticorpale che è anche più elevata rispetto alla prima. Ci vuole meno tempo e la risposta è maggiore, la concentrazione di anticorpi è più elevata e specifica. La risposta secondaria fa predominare le IgG (le IgM sono poche o assenti) o le cellule selezionate per quell'antigene.

Questi anticorpi sono anche più affini, ovvero legano meglio l'antigene e lo eliminano più velocemente perché durante la fase di proliferazione l'antigene seleziona quei cloni che vanno incontro ad un processo di mutazione somatica (ovvero piccole mutazioni) che riguarda il sito combinatorio dell'antigene e che permetterà all'antigene di selezionare l'anticorpo più affine. Questo processo è unico per i linfociti B. Nella duplicazione del DNA avvengono molte mutazioni, sempre nel sito che lega l'antigene, che vengono selezionate dall'antigene come quelle più affini. Quindi alla fine della risposta secondaria gli anticorpi sono di più, si riproducono più velocemente e sono più affini. Questa maturazione di affinità è il principio sfruttato nelle vaccinazioni: la prima dose funziona come immunizzazione primaria, la seconda dose come risposta vera e propria e nella terza si avranno anticorpi più affini e in quantità maggiore. La maggior affinità dell'antigene implica una migliore cinetica di legame, ovvero l'antigene viene

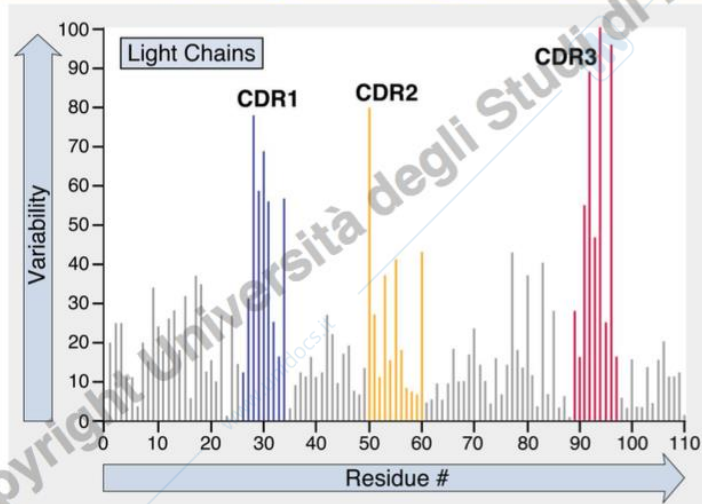


legato meglio e in minor tempo. Questo è favorito dallo scambio isotipico (*switch*) e dalla maturazione dell'affinità favorita dall'accumulo di mutazioni nelle zone ipervariabili.

Queste sono le zone di complementarità (verdi), sono le regioni che legano l'antigene, qui avvengono le mutazioni somatiche durante la maturazione della risposta secondaria. Sequenziando una serie di linfociti B, plasmacellule e anticorpi di una risposta secondaria si è visto che l'ipermutazione somatica è l'introduzione casuale di mutazioni puntiformi nelle regioni di complementarità (CDR) e nelle regioni variabili. Le cellule B producono Immunoglobuline mutate che vengono

selezionate in base alla loro affinità per l'antigene e maturano a plasmacellule. La maturazione di affinità avviene nelle risposte secondarie e terziarie. La variabilità dei residui amminoacidici di una catena leggera è associata a CDR1, CDR2 e CDR3 che sono le regioni che legano l'antigene. Lo scambio isotipico avviene a livello del DNA, nella stessa cellula la proteina IgM che veniva prodotta con una porzione variabile, vede il suo dominio variabile agganciato

Complementarity determining regions of immunoglobulin light chains



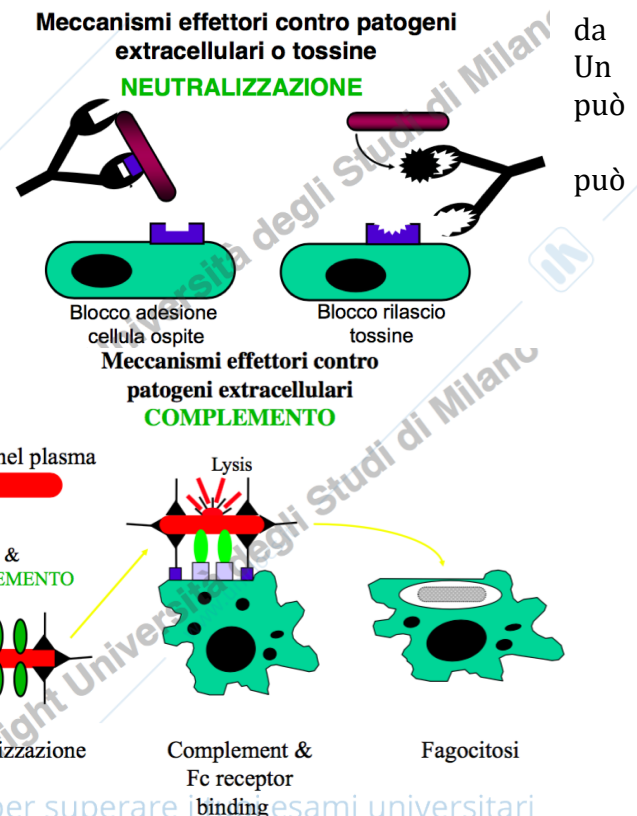
ad una regione costante diversa. Nello switch isotipico cambia la regione costante, non quella variabile! I linfociti B iniziano a produrre anticorpi di classe diversa perché cambia la regione costante che è quella che determina la classe. La regione variabile è la stessa perché l'antigene è lo stesso. Quindi da un punto di vista genetico, serve che si formi un RNA messaggero proveniente da una proteina di un gene già selezionato unito ad una regione variabile. Al 5' di ciascun gene costante ci sono delle sequenze ripetitive chiamate "regioni di switch" che interagiscono con la regione variabile e permettono questa ricombinazione.

La prima regione costante (blu) che si trova a livello del genoma è la IgM vicino alla regione variabile, perciò è facile che si formi come prima proteina la IgM. Se invece vogliamo la IgG dobbiamo vedere al 3' quale sia la regione costante, tagliamo tutta la porzione di DNA, e la regione variabile va a formare un anticorpo nuovo ma con la stessa regione variabile.

Funzioni Effettrici degli Anticorpi

Gli anticorpi, grazie alla loro specificità, fungono da molecole neutralizzanti ovvero legano i patogeni. Un patogeno può essere legato da un fagocita ma può essere anche un virus che deve farlo per sopravvivere. Il batterio legato da anticorpo non può interagire con il proprio recettore, quindi viene neutralizzato. Gli anticorpi contro il virus dell'influenza solitamente sono diretti contro l'emoagglutinina che sta sulla superficie del virus. Il potere neutralizzante negli anticorpi sta nell'impedire il legame del patogeno con il recettore cellulare della cellula ospite.

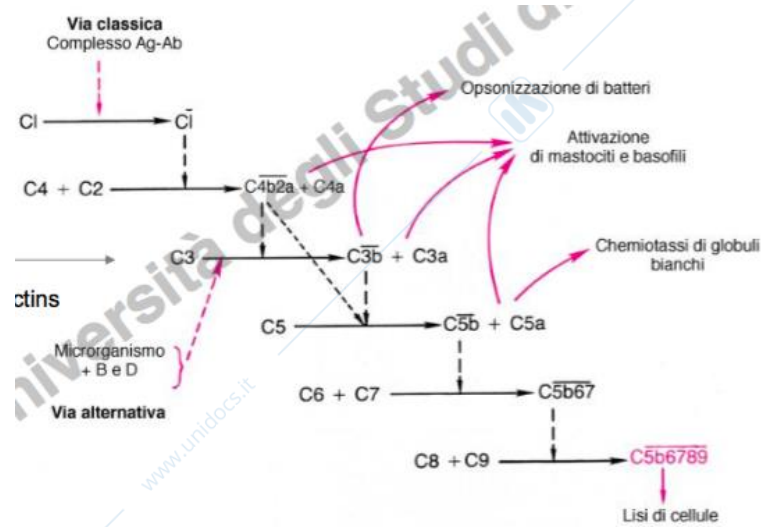
Se invece abbiamo un patogeno che produce una tossina (ad esempio il tetano, la difterite etc) produciamo anticorpi dopo la vaccinazione: usiamo la tossina



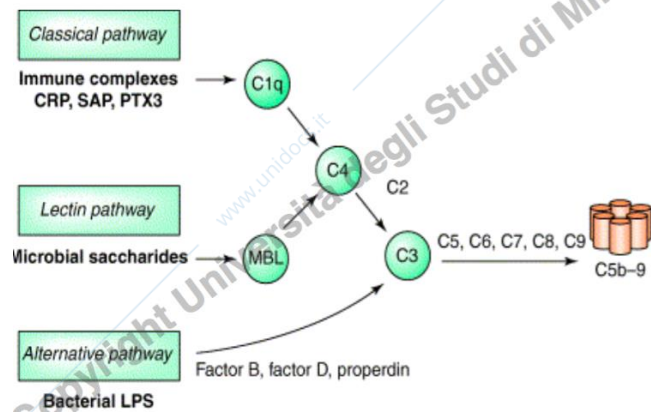
come antigene. La tossina viene bloccata dall'anticorpo e quindi non agisce più sulla cellula bersaglio, viene prevenuta la patogenicità e la morte.

I batteri negli spazi extracellulari sono riconosciuti da anticorpi specifici (ne è un esempio l'immunità contro lo streptococco) e possono indurre degli anticorpi che legano il patogeno con la porzione costante (Fc). Gli anticorpi specifici sono opsonizzanti: fagocitano meglio il patogeno grazie alla presenza di anticorpi specifici che agiscono da opsonizzanti.

C'è l'intervento anche del complemento: una serie di 30 proteine plasmatiche prodotte dal fegato (per la maggior parte) che si attivano a cascata ed hanno un'attività enzimatica. Ogni proteina agisce il substrato producendo altri frammenti. La loro nomenclatura è molto semplice: C, che sta per "complemento", seguito da un numero. Vanno da C1 a C9, ma l'attivazione non è sequenziale, i numeri derivano dalla sequenza di scoperta. C1 si attiva su C4 e su C2 forma complesso enzimatico (proteolitico) che agisce sul substrato, viene attivato e si formano dei frammenti ad attività biologica. C5 ad esempio è un fattore chemiotattico, mentre C3 e C2 sono fattori opsonizzanti. Il fine di questa cascata attivata dal complesso antigene-anticorpo è quello di formare un ultimo complesso che va da C5 a C9, detto "complesso di attacco in membrana". Questo si attacca alla membrana dei patogeni forandola, così si lisa la cellula bersaglio. Questo complesso è chiamato MAC (*Membrane Attack Complex*). Il complemento può essere attivato da diverse sequenze fino a che non si arriva a un prodotto comune C3, da qui le proteine sono attivate dalla C5 alla C9 e formano un complesso che aderisce alla superficie della cellula bersaglio polimerizzando, fa buco che uccide la cellula. Il complemento può essere attivato, oltre che dagli immunocomplessi (reazione antigene-anticorpo), direttamente dai polisaccaridi dalle LPS associati a patogeni. Questo è un sistema immunologico plasmatico filogeneticamente molto antico: nel feto il complemento è già a 70% rispetto a quello che avrà da adulto. Solo nei vertebrati questo sistema può essere attivato anche dagli anticorpi, gli altri organismi non ne possiedono.



Vie di attivazione del complemento



Gli Anticorpi Monoclonali

I linfociti B non hanno una buona crescita in vitro, mentre i linfociti T crescono grazie a fattori di crescita. Inoltre, a differenza dei linfociti T, i linfociti B in vitro non si stimolano bene, ovvero le fasi di produzione primaria e secondaria non avvengono.

Per stimolare linfociti B quindi bisogna sempre ricorrere ad un'immunizzazione in un ospite di un'altra specie. Dopo che abbiamo immunizzato l'animale, possiamo avere una produzione costante di anticorpi in vitro grazie alla scoperta degli anticorpi monoclonali da parte di Georges Köhler, Niels Jerne e César Milstein, premio Nobel nel 1984.

La risposta nell'animale è di tipo policlonale, ovvero la proteina che noi diamo all'animale ha più determinanti antigenici e quindi l'animale produrrà tanti anticorpi di specificità diversa per tutti gli epitopi che quella proteina somministrata contiene. Inoltre, il siero dell'animale è limitato, non possiamo usarlo in modo continuo o non siamo sicuri che sia pulito. Non può diventare un farmaco e nemmeno un *pull* diagnostico che riconosca una proteina nel plasma, come ad esempio il test di gravidanza che cerca la proteina gonadotropina.

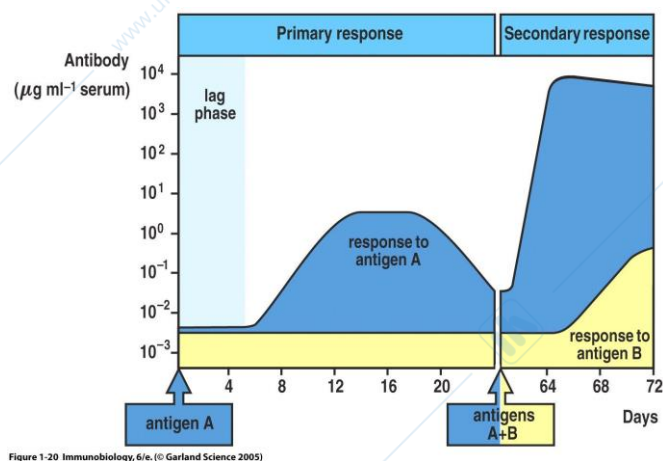


Figure 1-20 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

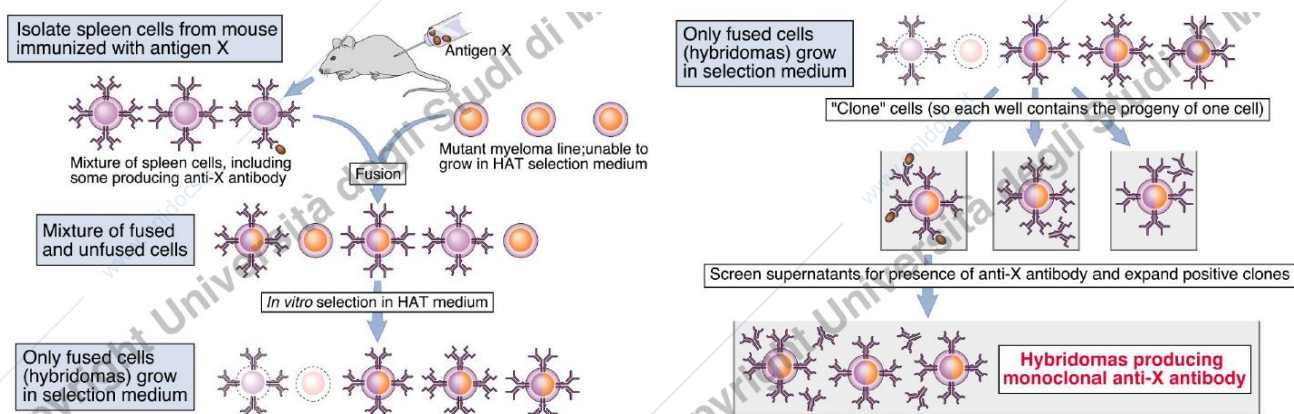
Per ottenere anticorpi in quantità industriali e che siano specifici con un solo epitopo, negli anni '60 si studiò la struttura degli anticorpi prodotti dai mielomi (tumori) perché questi producono anticorpi monoclonali (con catena leggera e pesante) senza però dirci verso quali specificità questa proteina è diretta. E' stato utile per comprendere la struttura degli anticorpi ma non per capire la loro specificità.

Si voleva arrivare ad avere anticorpi monoclonali che fossero omogenei, diretti verso un singolo epitopo (specificità). Per fare questo è stata messa a punto la tecnica dell'ibridazione che produce gli anticorpi monoclonali: si fonde un clone di linfociti B che produce l'anticorpo specifico e una cellula tumorale che gli consentisse la sopravvivenza. Si sono prodotti così gli anticorpi monoclonali.

Gli anticorpi monoclonali sono omogenei, ovvero tutti uguali tra di loro, e hanno specificità nota perciò sono utili in diagnostica e in terapia.

I problemi sono due:

- Vogliamo l'anticorpo, che può essere prodotto solo dal linfocita B;
- Ne vogliamo all'infinito.



Sfruttare l'immortalità della cellula tumorale

per produrre all'infinito fu l'intuizione geniale. Si scelse il mieloma perché è il tumore delle cellule B, quindi mantiene la struttura cellulare di cui abbiamo bisogno e si decise di fonderlo con la cellula B sana formando un ibrido in grado di risolvere i due problemi.

I linfociti B vengono presi dalla milza di un animale immunizzato, si fanno uno o due richiami per avere una risposta maggiore ed una maggiore selezione. I linfociti vengono fusi con le cellule di mieloma, Köhler e Milstein scelsero una linea di mieloma mutato per l'enzima HGPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) perché quando questo è mutato le cellule non riescono più a produrre purine attraverso la via dell'ipoxantina esogena ma devono per forza usare la via dell'acido folico endogeno. Se queste cellule vengono messe nel terreno selettivo AT che contiene ipoxantina, amino-opterina e timidina. L'ipoxantina è un veleno che blocca la via dell'acido folico. In un terreno AT la cellula del mieloma non riesce a sopravvivere, il linfocita B invece riesce a sopravvivere perché pur avendo bloccata la via dell'acido folico, segue

la via dell'ipoxantina. Un linfocita B normale non cresce nel terreno di cultura, mentre gli ibridi sono in grado di sopravvivere.

Gli ibridi possono essere produttori o non produttori e possono produrre anche antigeni diversi da quelli che ci interessano perciò dobbiamo clonare ognuno di questi ibridi. Per fare il clonaggio della popolazione che ci interessa dobbiamo fare una diluizione limite: diluendo le cellule possiamo

distribuirle nelle piastre a 96 pozzetti (oggi siamo a 384 pozzetti) per arrivare ad aver una cellula ogni 3 pozzetti, così da avere una buona possibilità che ci cresca il clone desiderato. I cloni che non ci interessano si riproducono lo stesso, per questo si fa un test ELISA sui pozzetti: si prende il surnatante e la proteina che già avevamo e si va a vedere se nel surnatante ci sono gli anticorpi che riconoscono l'antigene che ci interessa.

Una popolazione mista viene clonata e diluita in modo che ciascun pozzetto contenga la progenie di una cellula, per essere sicuri di questo si fa la diluizione limite. Dopo 2-3 giorni si vanno a vedere le cellule di tutti i pozzetti di almeno 10 piastre e si vede in quale pozzetto sta crescendo qualcosa. Immunizzando gli animali si ottiene un reattivo specifico come l'anticorpo.

Attualmente, gli anticorpi si fanno fare dalle ditte dopo aver dato l'antigene che ci interessa.

Applicazioni pratiche degli anticorpi monoclonali

- Dosaggi immunologici per uso diagnostico di ricerca: test diagnostici grazie ai quali abbiamo scoperto e dosato le citochine.
- Purificare antigeni mediante immunoaffinità: mettiamo gli anticorpi monoclonali in una colonna di silice e facciamo passare una sospensione cellulare, se la cellula produce la proteina X (riconosciuta dagli anticorpi immessi da noi) allora noi possiamo agganciare la proteina e diluirla ovvero purificarla. Questa è detta "colonna di immunoaffinità", la risposta immune ci serve come sistema di purificazione.
- Analisi e purificazione di sottopopolazioni cellulari: per sapere se nel circolo sanguigno abbiamo più linfociti B o T andiamo con gli anticorpi anti-B220 (che riconoscono gli Ab B220 prodotti dai linfociti B come marcatori) a vedere quante cellule rispondono a quell'anticorpo.
- Possiamo classificare i tumori e i vari stadi dei melanomi che hanno marcatori specifici.
- Possiamo dosare il PSA (antigene prostatico) che ci permette di individuare l'ipertrofia prostatica o anche i tumori prostatici.
- Possiamo identificare gli antigeni di differenziazione, nei linfociti T CD3 CD4 CD8.
- Possiamo ottenere anticorpi che ci permettono di neutralizzare delle infezioni come terapia.
- Possiamo analizzare il proteoma, ovvero tutte le proteine che un organismo produce.

Gli anticorpi monoclonali sono utilizzati in analisi patologiche, come il test radioimmune (RIA, *RadioImmune Assay*) o il test ELISA (*Enzyme Linked Immune Ad Sorbant Assay*). Il *western blot* è una tecnica usata per ritrovare la proteina separata su gel. Abbiamo una sospensione di proteine che facciamo correre su un gel di agarosio (ci permette di visualizzare le proteine), separate mediante elettroforesi su delle membrane assorbenti. *Blot* significa trasferire le cellule dal gel (utile per separare e visualizzare le proteine, ma non per lavorarci) su membrane assorbenti. Lasciando una notte in determinati tamponi con sopra questa membrana, si trasferisce la proteina dal gel alla membrana che è molto più manipolabile. Per riconoscerla, la proteina agisce ancora con il *blotting* e ci permette di visualizzare il PM della proteina e la sua presenza, di immunoprecipitare l'immuno-complesso per purificarlo, etc.

- Gli anticorpi monoclonali sono usati in vivo come anticorpi in grado di sopprimere il sistema immune, da utilizzare nella terapia dei trapianti di organi.

Ad esempio, l'anticorpo *muromab* è utilizzato contro il CD3 (molecola associata al recettore dei linfociti T) che è citotossico, ovvero distrugge i linfociti T ed è utile nei pazienti che hanno avuto un trapianto di organo. Oltre alle terapie immuno-soppressive che bloccano la produzione delle citochine e dei fattori di crescita prodotti dai linfociti B, si cerca di eliminare i linfociti T già maturi. Ogni volta che c'è segno di rigetto vengono somministrati questi anticorpi.

Il *remicade* è stato uno dei primi anticorpi messi in atto per bloccare il TNF perché viene attaccato specificatamente. Non ha funzionato molto bene perché gli anticorpi sono proteine che quindi vengono degradate abbastanza velocemente. La terapia non è a lungo termine, le proteine una volta inoculate non si mantengono a lungo. Inoltre queste proteine provengono da animali: è stata immunizzata un'altra specie, tutti gli anticorpi monoclonali sono anche dei potenziali antigeni per la specie che li riceve, perciò si ha una risposta immune. Dopo il secondo ciclo di terapia l'efficienza dell'anticorpo cade perché si sono sviluppati nell'ospite degli anticorpi anti-specie che ci distruggono la molecola e sensibilizzano l'ospite, ovvero qualsiasi anticorpo di quella specie può scatenare una risposta secondaria e/o terziaria che lo elimina. La genetica ci ha aiutato perché questi anticorpi possono essere umanizzati: la genetica ci permette di modificare gli ibridi geneticamente e prelevare tagliando solo le regioni del genoma che codificano per la porzione variabile, inserirli nella cellula dell'ibrido umano (cellula di mieloma umano) e far sì che la cellula produca soltanto anticorpi umanizzati in grado di mantenere la regione variabile ottenuta dal topo.

Un altro anticorpo usato come antitumore è il *rituximab* usato per il CD20 per trattare i linfomi a cellule B. Il *transuzumab* (mab = monoclonal anti-bodies, molecola derivante da un ibrido che è un farmaco) ha lo stesso effetto. Nel tumore alla mammella che esprime il recettore per le IgF questo anticorpo viene specificatamente usato per bloccare questo oncogene. Questi sono usati di routine per quei tumori che hanno quell'antigene specifico. La terapia dei tumori è personalizzata sulla base delle molecole che i tumori esprimono.

31\03\2016

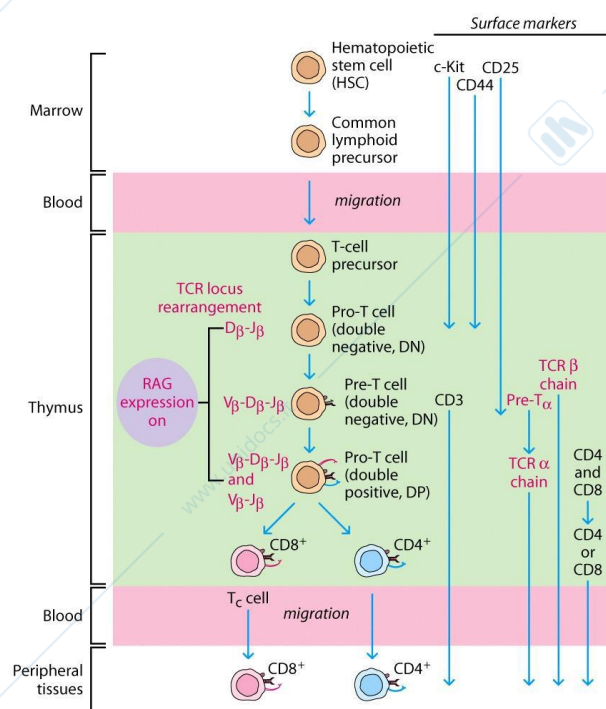
LINFOCITI T

Questi linfociti prendono il nome dal fatto che si sviluppano nel timo, si originano da un precursore staminale nel midollo osseo comune anche ai linfociti T. Migrano subito attraverso il circolo sanguigno come pro-timociti e proprio durante la fase di maturazione timica acquisiscono il recettore per l'antigene. In questa fase abbiamo il passaggio di cellule con un fenotipo diverso:

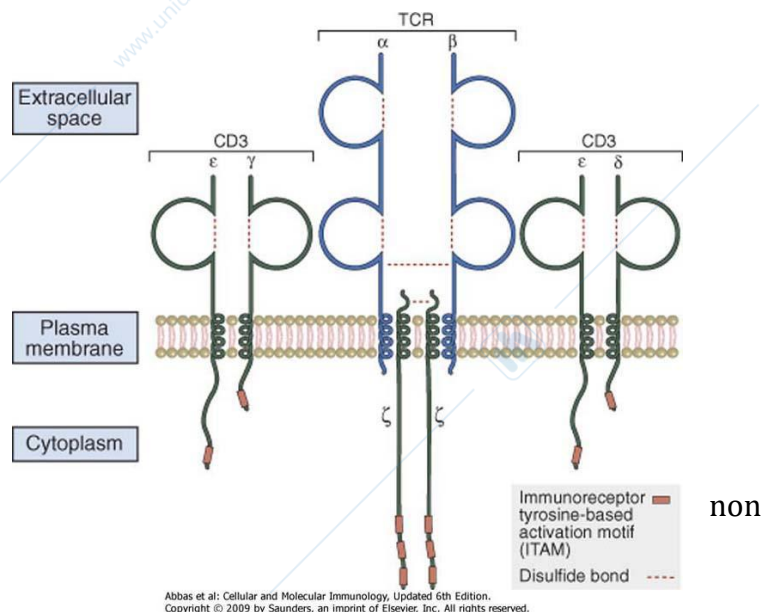
- Cominciano ad apparire le catene del recettore: prima β , poi α ;
- Avvengono i riarrangiamenti del dominio variabile del recettore dei linfociti T, il locus che codifica per le regioni variabili viene riarrangiato e sono espresse ad alto livello le recombinasi;
- I linfociti arrivano ad uno stadio in cui esprimono il recettore
- Avviene la fase dei "doppio positivi" perché le cellule esprimono due marcatori caratteristici chiamati CD4 e CD8;

Appena prima che i linfociti escano maturi dal timo, i marcatori CD4 e CD8 invece di essere presenti sulla stessa cellula separano due popolazioni diverse: CD4+ e CD8+. Entrambi esprimono il recettore per l'antigene ma si differenziano per la presenza del marcatore CD4 o CD8.

Dal CD4 derivano tutte le cellule T-helper, mentre da CD8 derivano tutte le cellule T-citotossiche.



Il recettore acquisito durante la maturazione timica appartiene alla famiglia delle immunoglobuline, la maggior parte dei linfociti T possiede il recettore α - β perché è costituito da un eterodimero, una catena α e una β , ciascuna costituita da due domini, uno costante e uno variabile. I due domini variabili costituiscono il sito di legame dell'antigene e sono quindi i due domini che durante la maturazione timica sono stati riarrangiati. Come il recettore di membrana dei linfociti B, ha una catena citoplasmatica sufficientemente lunga da essere fosforilata e quindi trasmettere il

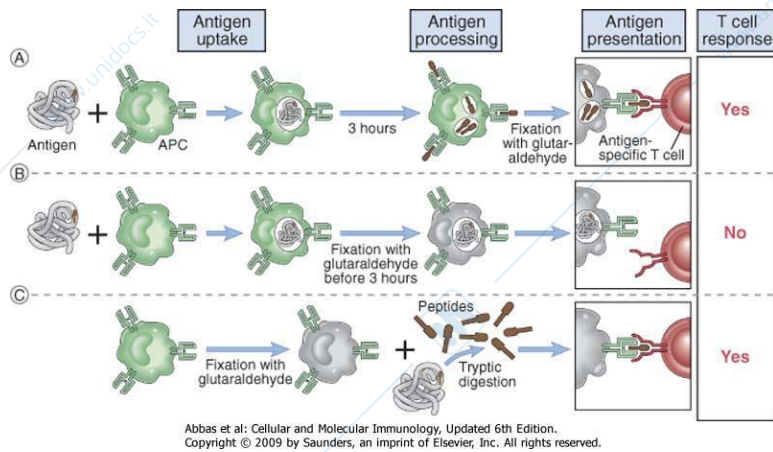


segnale per cui le due catene α e β si associano ad una serie di altre catene (2 catene ϵ , 2 γ e 2 ζ) che si associano al recettore stesso. Anche queste appartengono alle globuline ma non sono polimorfe, sono costanti e identificano i linfociti T assieme al recettore perché non si modificano (non sono variabili). A differenza dei recettori per i linfociti B, non sono variabili perciò hanno un nome vero e proprio CD3 (*Cluster Differentiation 3*) dal fatto che nella catena ϵ c'è un sito che lega degli anticorpi monoclonali che riconoscono sempre quella molecola costante per tutti i linfociti T. Anche CD3 è un marcatore per i linfociti T che si associa al recettore. Hanno siti di fosforilazione nel citoplasma per trasmettere il segnale di attivazione.

Il riarrangiamento avviene a livello del DNA. Riarrangiare significa utilizzare per produrre il dominio variabile della catena α e β dei frammenti genici diversi (*variable diversity joining*) presenti in coppia multipla nel DNA genomico. Ciascuno di questi frammenti (J, D e B ad esempio) si unisce per andare a formare una regione variabile nel singolo linfocita T che sarà diversa da recettore a recettore. Avviene lo stesso per la catena α , abbiamo due segmenti (*variable e joining*) che si uniscono per andare a formare la regione variabile. Il processo è esattamente lo stesso di quello che avviene per il recettore per i linfociti B, ma questi hanno geni situati in cromosomi diversi, cromosoma 7 per la catena β e cromosoma 14 per la catena α , a loro volta diversi per i loci che codificano le catene pesanti. Il riarrangiamento di questi loci avviene specificatamente nella popolazione destinata a diventare linfociti T, non vengono riarrangiati nelle altre cellule dell'organismo (negli epatociti queste sequenze saranno *germ line*).

I linfociti T quando migrano dal timo hanno riarrangiato il recettore, acquisito il CD3 (quindi il recettore può funzionare, trasmettere il segnale), si sono differenziate in due sottopopolazioni e possono andare a colonizzare gli organi linfoidi secondari, in particolare la zona subcorticale dei linfonodi, la polpa bianca della milza e tutto il tessuto linfoide.

I linfociti T nel riconoscimento dell'antigene sono più esigenti perché mentre il linfocita B riconosce con il recettore antigeni nativi, ovvero riconoscono le proteine così come vengono rilasciate dai batteri, il linfocita T non si lega mai ad antigeni nativi ma si legano solo a dei peptidi (frammenti proteici di circa 15-18 AA) presenti sulla superficie di una cellula bersaglio, non riconoscono antigeni solubili e non processati. Per essere visti in modo adeguato dal recettore, occorre che i peptidi siano espressi in superficie da molecole particolari dette molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC, major histocompatibility complex). Istocompatibilità significa compatibilità tra tessuti, queste molecole sono state studiate quando si sono cominciati a fare i trapianti. Le MHC servono a presentare gli antigeni ai linfociti T per attivarli.



L'antigene virale è espresso sulla cellula infettata dal virus o sulla cellula tumorale, quindi i linfociti ricircolano nel sangue. Non interagiscono con molecole isolate presenti sui patogeni ma soltanto con molecole processate (ridotte a piccoli frammenti) legate a MHC e associate alle cellule dell'ospite. Questo processo è detto "processazione e presentazione dell'antigene ai linfociti T". Per avere un'attivazione completa dei linfociti T

occorre che i linfociti T specifici di un antigene si leghino alla cellula bersaglio.

Questo è stato visto attraverso esperimenti che dimostrarono che se si mette il linfocita T (già stimolato dagli antigeni) in presenza dell'antigene nativo non succede nulla perché è necessaria un'altra cellula (M0, macrofago) che ha bisogno di tempo (circa 60 minuti) per poter legare il linfocita T. In questo tempo la cellula ingloba l'antigene, lo processa e lo esprime in superficie. Con i marcatori fluorescenti si vide che l'antigene torna in superficie, che i tempi della processazione sono lunghi, che non basta l'antigene solubile ma deve essere legato ad un'altra cellula e processato.

Altri esperimenti dimostrarono che durante il periodo di processazione le cellule devono essere vive, non fissate perché se si aggiungeva un fissativo come la glutaraldeide o un altro veleno metabolico la presentazione non avviene perché la cellula deve essere viva per processare l'antigene e produrre il peptide. Se il fissaggio viene fatto dopo 3 ore, ovvero dopo che l'antigene è stato espresso, allora la stimolazione avviene comunque perché la digestione dei peptidi già avvenuta e quindi la cellula non ha più bisogno di energia. Lo stesso avviene se si preparano in modo sintetico dei peptidi digeriti con tripsina e si mettono con dei macrofagi fissati, questo per dire che la digestione è necessaria. Certi tumori pur avendo degli antigeni propri esprimendo quindi questi peptidi, non riescono ad essere visti perché limitano la sintesi delle molecole MHC (la down-regolano).

Le cellule che effettivamente possono presentare l'antigene ed iniziare la risposta immune sono:

- Le cellule dendritiche
- Linfociti B
- Monociti/macrofagi
- Le cellule del Langherans

Le prime tre sono cellule che appartengono alla linea mieloide e sono cellule fagocitiche

Le cellule dendritiche sono una popolazione specializzata di macrofagi che si ritrovano a livello dei linfonodi e si chiamano così per la loro capacità di sviluppare pseudopodi che gli permettono di fagocitare. Sono molto attive nella fagocitosi del materiale estraneo tramite il recettore Fc, i recettori per il mannosio, etc.

Sono cellule che esprimono costitutivamente il MHC e contribuiscono all'attivazione del linfocita T.

Anche i linfociti B possono catturare l'antigene con il recettore di superficie, internalizzarlo e processarlo. Il peptide di quello stesso antigene solubile è in grado di catturare i linfociti T-helper. Il linfocita B appena attivato deve proliferare perciò ha bisogno di fattori di crescita portati dal linfocita T-helper. Il linfocita B da solo può sia catturare l'antigene, attivarsi ed produrre anticorpi sia processare l'antigene, esprimere dei peptidi che attivano i linfociti T-helper, utili ad aumentare la risposta. Si parla di cooperazione T-B perché è necessario che si attivi una risposta T anche a partire da un antigene (che invece avrà bisogno di anticorpi per

essere eliminato). Quindi gli stessi linfociti B non solo esprimono molecole MHC di classe I ma sono in grado di catturare l'antigene e processarlo.

Le cellule dendritiche sono state molto studiate, ne possiamo descrivere alcune convenzionali che si trovano nella cute e nei linfonodi che sono le prime addette a catturare molecole estranee. Esprimono sulla superficie recettori Fc, per il complemento e recettori Toll che sono quelli utili all'attivazione di questa cellula che deve produrre anche tante citochine per presentare al meglio l'antigene. Le cellule dendritiche convenzionali esprimono al meglio i linfociti T *naive*.

Le cellule dendritiche plasmacitoidi sono quelle che circolano nel sangue e quindi possono catturare antigeni nel circolo, anche se li troviamo nella zona corticale dei linfonodi.

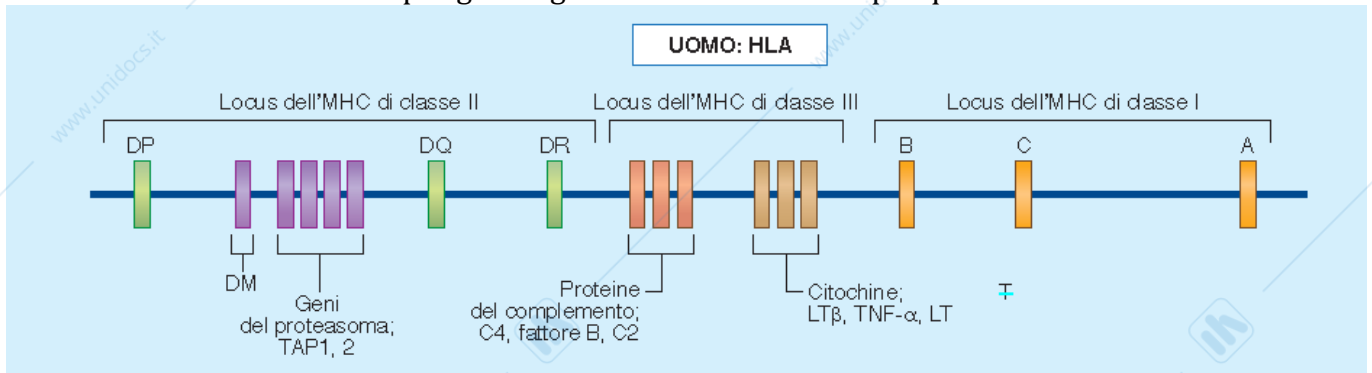
Le fasi di processazione dell'antigene

1. **Internalizzazione** se l'antigene è esogeno, mentre se l'antigene è prodotto dalla cellula stessa (magari già infettata da virus) ovvero endogeno deve avere accesso alle vie di degradazione intercellulare.
2. La **degradazione** di questi antigeni è solitamente limitata perché non si arriva ai singoli AA, ma rimangono piccoli peptidi di 15-20 AA che devono seguire vie citoplasmatiche che gli permettono di legarsi alle molecole MHC.
3. La **formazione del complesso** di istocompatibilità consiste in una serie di meccanismi che permettono agli antigeni peptidici di legare molecole MHC.
4. Quest'ultima attraversa il Golgi e va verso la superficie cellulare dove potrà essere espresso e riconosciuto dai linfociti T. Questo ultimo processo è la **presentazione** dell'antigene.

Il complesso maggiore di istocompatibilità è un insieme di più geni che deve il suo nome al fatto che queste proteine furono scoperte studiando i trapianti di cute tra animali. Si vide che ci sono dei loci ben definiti in grado di codificare per queste molecole. Sono responsabili del rigetto di organi.

Si chiama anche HLA (Human Leucocytes Antigens) e la tipizzazione tissutale tra donatore e ricevente deve essere altamente affine. Questa è diversa dalla tipizzazione a livello dei gruppi sanguigni, l'HLA ha un'enorme varietà allelica della popolazione.

Il suo locus si trova nel braccio corto del cromosoma 6, si distinguono almeno tre zone che codificano a cominciare dal 5': il locus che codifica per gli antigeni MHC di classe II, al centro abbiamo il locus che codifica per gli antigeni MHC di classe III e poi quelli di classe I.



Tutta la zona di DNA di classe III è essenziale per la risposta immune perché tra questi loci si trovano sempre geni che codificano per citochine (il TNF e la linfotossina) e/o fattori del complemento C4 e C2.

Le molecole di classe I hanno i loci A, B e C, mentre quelli di classe II sono chiamati loci DR, DQ e DP.

Tutti i loci sono molto polimorfi, ciò vuol dire che ci sono tante forme alleliche diverse per ciascun loco. Questo spiega la grande variabilità da individuo a individuo. Non abbiamo riarrangiamenti, solo ed esclusivamente alleli diversi.

Questi loci sono stati identificati grazie ai ceppi *imbred* (ceppi con tutti i geni uguali) che si ottengono per incrocio tra consanguinei (fratello-sorella) per 28 generazioni. Ciò assicura identità genetica all'interno dei ceppi. Studiando la capacità di trapianto in ceppi *imbred*, si vede che la compatibilità è alta perché non abbiamo variabilità genetica.

MHC di classe I

Queste molecole hanno un dominio immunoglobulinico, sono molecole di membrana che per legare l'antigene hanno tre domini $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. Quest'ultimo è l'unico che ha forma globulare, gli altri due assumono una conformazione a "tasca" con delle catene β -planari che fanno da fondo e delle α -eliche ai lati. Formano l'incavo di legame per il peptide antigenico. Il peptide va a legarsi sulle due α -eliche formate dal dominio $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Tutte le molecole di classe I sono fatte così.

Questa molecola per essere stabilizzata deve essere associata con un legame non covalente alla $\beta 2$ microglobulina che ha la stessa forma globulare. Queste molecole di classe I sono espresse da tutte le nostre cellule nucleate e piastrine, sono un eterodimero: una catena α molto polimorfa associata non covalentemente alla $\beta 2$ (costante).

Queste molecole sono espresse in modo codominante, ovvero è espresso sia l'allele materno che quello paterno. L'espressione codominante è importante per favorire una maggiore varietà di antigeni MHC e per la capacità di presentare antigeni. Se ciascuna molecola è variabile e quindi polimorfa, avremo la possibilità di legare antigeni diversi.

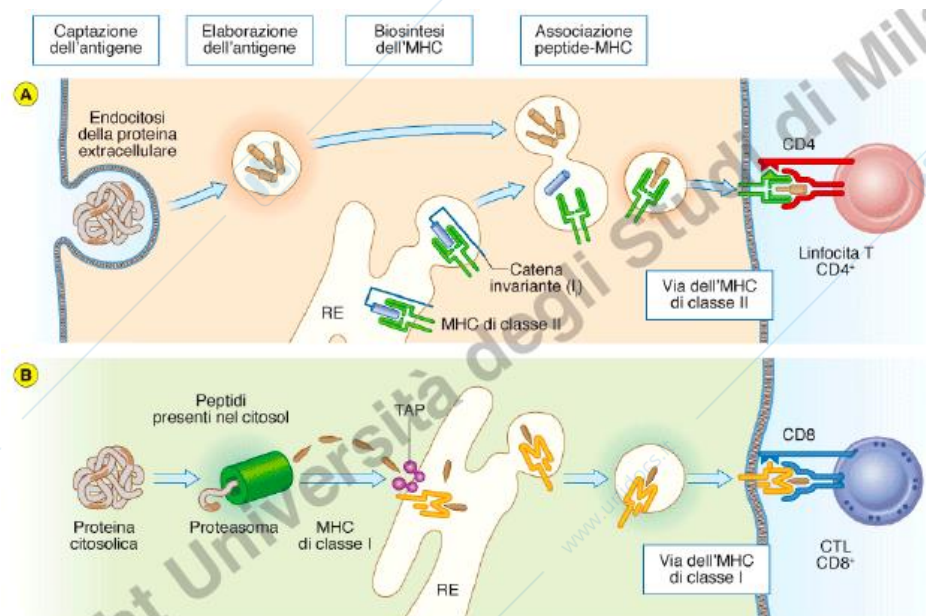
Inoltre, le HLA legano e presentano peptidi in forma endogena, ovvero quelli prodotti dalle cellule stesse. Se il virus entra nella cellula ed esprime proteine, queste vengono processate e saranno le molecole di classe I a presentare le molecole virali sulla superficie. Il linfocita T citotossico riconosce, ovvero lega, la molecola in superficie perché le molecole di classe I hanno un sito di legame per il CD8+ (un marcatore dei citotossici). Si raggiunge lo scopo di uccidere una cellula infettata da virus perché esprime l'antigene virale che sarà riconosciuto dal linfocita T citotossico che uccide la cellula.

MHC di classe II

Le molecole di classe II sono degli eterodimeri: hanno una catena α associata non covalentemente a una β , un dominio non polimorfo e il dominio N-terminale che ha anch'essa due α -eliche per legare il peptide e le catene β che formano la base della tasca. Le molecole di classe II non hanno espressione ubiquitaria come quelle di classe I e si trovano solo sulle cellule che esprimono l'antigene (dendritiche, linfociti B e macrofagi). Sono codificate dalla regione LHA D suddivisa in diversi loci espressi in maniera codominante ed estremamente polimorfi: DR, DQ e DP. Legano e presentano peptidi di forma esogena e sono importanti per attivare i linfociti T-helper. Hanno siti di legame per il CD4.

Il contatto tra le molecole e l'antigene avviene nei fagolisosomi.

Innanzitutto, c'è la presentazione di un antigene esogeno viene catturato e digerito, i peptidi vengono prodotti e trasportati attraverso il reticolo endoplasmico nella stessa zona in cui vengono sintetizzate molecole MHC di



che

le

classe II. Dai ribosomi della cellula (sul reticolo endoplasmico) vengono prodotte le due catene α e β . C'è una catena invariabile (asticella blu, nell'immagine) che stabilizza queste molecole durante il transito nel reticolo endoplasmico.

Prima di attraversare il Golgi le catene si trovano immagazzinate in vescicole dove si trovano anche dei peptidi: si stacca la catena invariabile e il peptide occupa la zona (*clap*) destinata a lui stesso.

Il complesso molecole MHC di classe II-peptide va in superficie attraverso il Golgi. Qui, se l'antigene è esogeno, quindi estraneo alla specie, ci può essere un linfocita T-helper che riconosce questo antigene, lo lega con il proprio recettore CD4 attivandosi.

Può succedere che queste molecole, che sono normalmente espresse sulla superficie, abbiano un peptide legato (non necessariamente un peptide estraneo). Spesso questo peptide viene dalla degradazione proteica endocellulare.

Se una cellula è invece infettata da virus, questa produce una proteina citosolica che viene degradata dal proteosoma. Viene in seguito trasportata nel reticolo endoplasmico dove i peptidi si associano e, anche in questo caso, abbiamo la molecola di classe I che presenta l'antigene esogeno riconosciuto da un linfocita T specifico CD8+, si lega e attiva il linfocita T citotossico.

Antigeni esogeni o endogeni vengono quindi processati, il linfocita T CD8 e CD4 riconoscono l'antigene opportunamente presentato.

Primo segnale: specificità, se l'antigene viene opportunamente presentato abbiamo l'attivazione dei linfociti T. Questo non è sufficiente a dare un segnale completo di attivazione, CD4 e CD8 devono essere coinvolti. Queste due sono glicoproteine presenti sulla superficie dei linfociti T citotossici che appartengono alla

famiglia delle immunoglobuline e si legano alle regioni non polimorfe delle catene LHC. CD4 si lega nel dominio della $\beta 2$ e CD8 nel dominio $\alpha 3$. CD4 lega MHC di classe II, mentre CD8 lega MHC di classe I.

Secondo segnale: amplificazione che tiene unite le cellule per il tempo sufficiente a trasmettere questi due segnali.

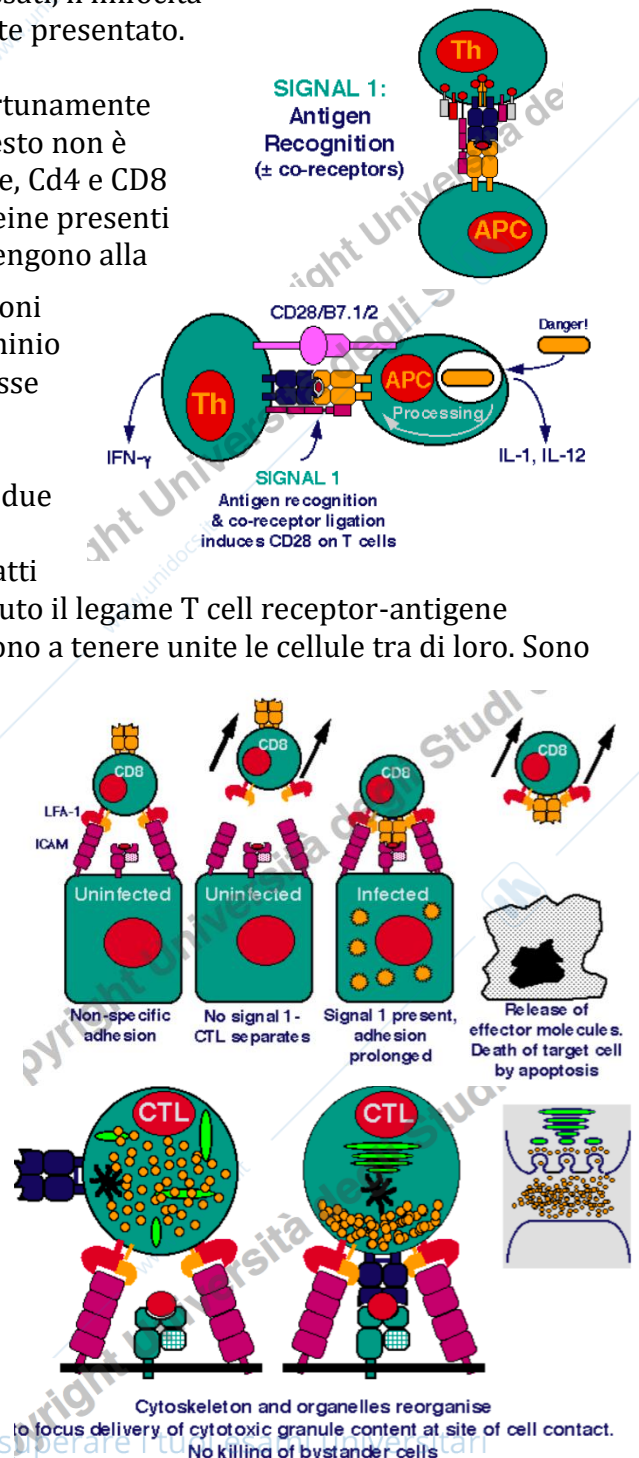
Ci sono però altre molecole di adesione, si parla infatti di "sinapsi immunologica" perché dopo che è avvenuto il legame T cell receptor-antigene possono giungere diversi leganti recettori che servono a tenere unite le cellule tra di loro. Sono coppie di molecole accessorie (B7, CD28, CD22, CD45, etc.) e tra queste ritroviamo ICAM e LFA1, molecole che prendono parte all'infiammazione, ma anche molecole di adesione che si devono legare tra loro per stabilizzare e amplificare il legame di attivazione.

L'assenza di segnali di co-stimolo spesso ci salva dall'attività di linfociti autoreattivi che potrebbero essere la causa dell'inizio di certe patologie autoimmuni.

Azione dei linfociti T citotossici

I linfociti T citotossici (CTL) a livello di fenotipo sono CD3+ perché hanno un recettore e sono CD8+ perché posseggono la molecola accessoria che stabilizza il legame.

Il loro ruolo è distruggere altre cellule dell'organismo. Anche i macrofagi possono



uccidere per fagocitosi o produzione di TNF ma la loro azione non è così specifica. Sono responsabili del rigetto da trapianto perché riconoscono l'incompatibilità, anche con l'attivazione dei macrofagi.

Ci difendono in continuazione perché uccidono i virus quando questi hanno già infettato la cellula. Possono anche uccidere cellule tumorali però i tumori hanno messo in atto meccanismi di difesa perciò non sappiamo a posteriori quanto il linfocita T abbia impedito l'insorgenza di tumore perché questo non si sviluppa. Statisticamente le trasformazioni tumorali avvengono in continuazioni, ma noi non le vediamo se hanno agito prima i linfociti T.

I linfociti T uccidono sempre inducendo apoptosi nella cellula bersaglio.

La prima fase è un contatto stabile con la cellula infettata. Il contatto è mediato non solo dalle cellule di adesione perché sarebbe troppo temporaneo, perciò c'è anche il contatto con l'antigene. La cellula infettata esprime antigeni virali che vengono riconosciuti dal linfocita T, i co-stimoli fanno sì che il legame sia forte, il linfocita uccide la cellula bersaglio e poi può staccarsi e andare a uccidere altre cellule. In vitro, si vede che lo stesso linfocita si rigenera fino a 4 volte, in vivo non sappiamo che attività abbia.

Il riconoscimento specifico dell'antigene determina una modifica del citoscheletro della cellula T citotossica con la redistribuzione di granuli contenuti nel citoplasma delle cellule T. La redistribuzione dei granuli avviene a livello della giunzione tra cellula bersaglio e linfocita T. I granuli vengono segreti nel microspazio intracellulare. Questi granuli contengono proteine perforine e granzimi. Le perforine sono proteine che vengono rilasciate, si incastrano nella membrana della cellula bersaglio, polimerizzano e formano dei buchi (pori).

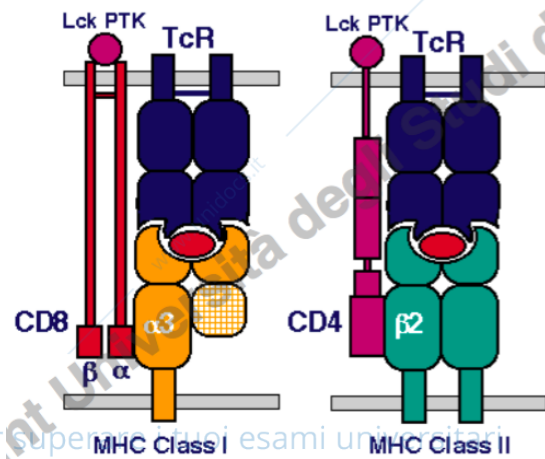
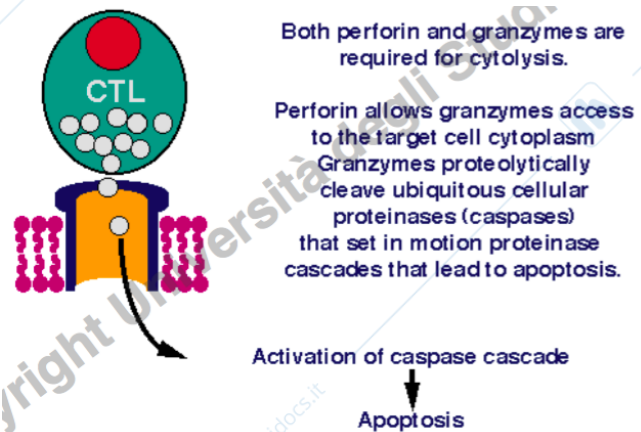
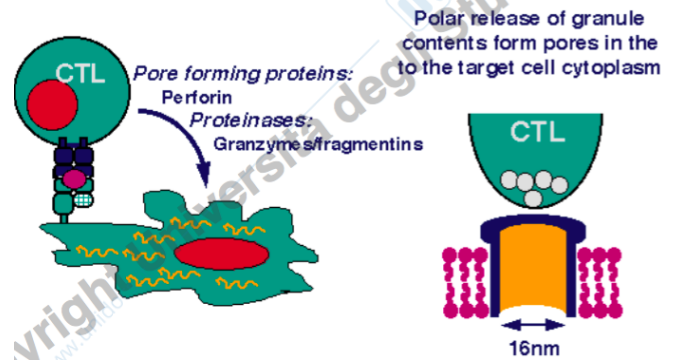
Attraverso questi pori i granzimi (o frammentine) entrano nella cellula e vanno ad attivare le proteasi, le caspasi iniziati. Il sistema è quindi duplice. I pori sono di circa 10nm, la sequenza di queste perforine è molto simile alla sequenza del C9 ed infatti entrambi fanno i buchi.

Con il cromo 51 (il cromato che si lega in maniera aspecifica a proteine del citoplasma) si vede che dopo che i linfociti citotossici hanno ucciso, il citoplasma esce dalla cellula e si può recuperare la radioattività nel sovrantante che è funzione di quante cellule vengono uccise. Oggi si usano marcatori fluorescenti perché l'uso di materiale radioattivo è costoso, pericoloso per chi lo usa e difficile da smaltire.

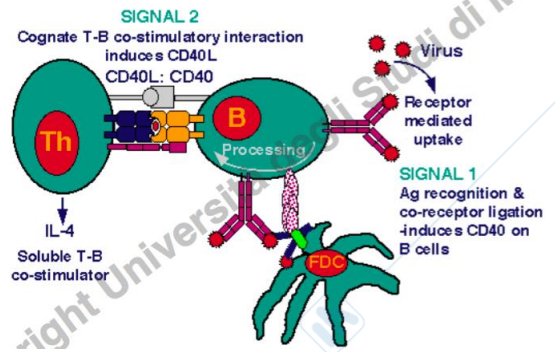
1/04/2016

Azione dei linfociti T-helper

I linfociti T-helper sono cellule che promuovono la risposta cellulare attivando le risposte macrofagiche, collaborando con i linfociti B nella produzione di anticorpi. Sono cellule CD3+ e CD4+, non sono citotossici: la loro attività fondamentale è produrre interleuchine, delle citochine il cui nome significa proprio "proteine solubili prodotte dai

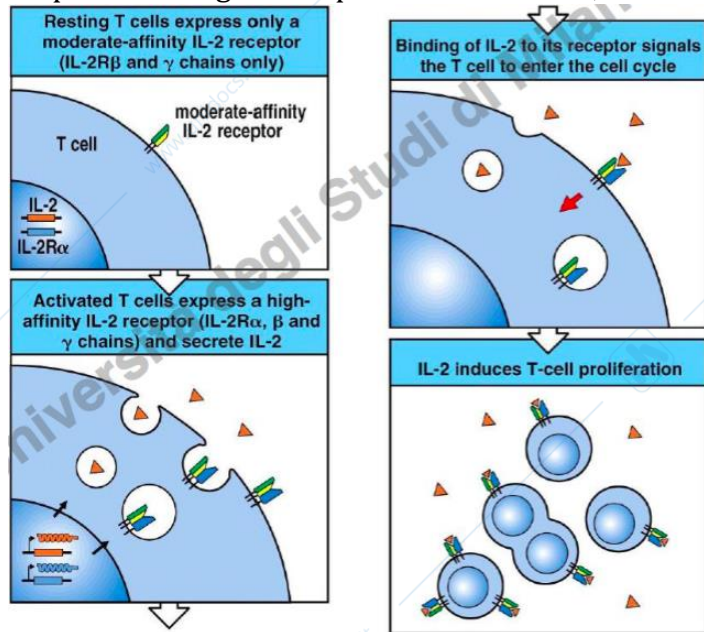


linfociti". I T-helper esprimono il CD4, il recettore con il CD3 associato che riconosce l'antigene processato associato alle molecole MHL di classe II. Il CD4 ha infatti dei siti di legame specifici con il dominio $\beta 2$ dell'HLA di classe II.



Il linfocita B necessita di due segnali per una completa attivazione:

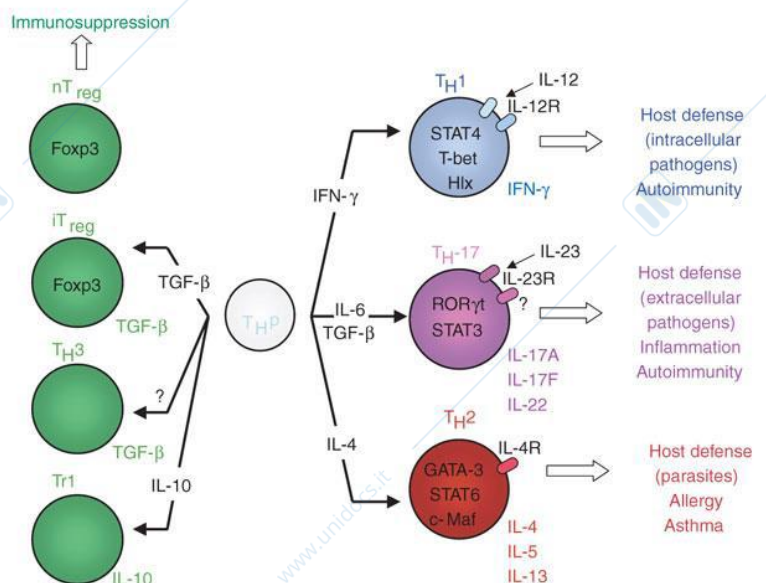
- Quando il linfocita B riconosce il virus tramite l'anticorpo di superficie, abbiamo un segnale 1 di specificità perché è l'antigene specifico che attiva l'anticorpo. Questo viene internalizzato, processato, i peptidi associati all'antigene vengono riespressi sulla superficie associati alle molecole HLA classe II e quindi si attiva il linfocita T-helper verso lo stesso antigene o verso porzioni dell'antigene virale.
- Il segnale 2 è di co-stimolazione: il T-helper è ora in grado di produrre citochine, come l'IL-4 che è in grado di interagire sui linfociti T stessi facilitando nella differenziazione a plasmacellule e la produzione di anticorpi.



L'immunodeficienza severa, dovuta ad esempio ad HIV, è una patologia grave perché in assenza delle T-helper CD4+ infettate dal virus non avremo né una risposta anticorpale a qualsiasi antigene né una risposta cellulare per i linfociti T citotossici.

Il linfocita T-helper, dopo essersi attivato, prolifera grazie all'IL-2(citochina) prodotto da lui stesso. Il linfocita T-helper non attivato è chiamato T-resting perché non prolifera e non esprime i recettori ad alta affinità per IL-2 ma presenta solo un recettore a moderata affinità. Quando arriva il segnale di attivazione da parte dell'antigene, attiva subito la produzione di questa citochina(IL-2) e in contemporanea esprime sulla superficie una terza catena(γ) che forma un recettore ad alta affinità per IL-2(legando le due catene α e β aumenta l'affinità del recettore). L'attività è autocrina perché le citochine prodotte dalla cellula stessa gli servono a proliferare.

Il T-helper riceve un'attivazione genica, una trascrizione e la produzione della proteina. I tempi di espressione dell'mRNA richiede tra i 15 e 30 minuti dopo la ricezione del segnale da parte dell'antigene, 10volte di più per l'NF-kB e 100 per il c-Fos(protooncogene: proteina di legame nucleare). IL-2 si attiva dopo



45 minuti risalendo di 1000 volte, le altre citochine (IL-3, TGF- β) impiegano circa 1-2 ore: questa è la risposta *early*, può arrivare fino alle 20 ore. Le molecole di adesione (VLA, *very late antigene*) che servono a mantenere in loco il linfocita T sono *late* perché arrivano dai 3 ai 5 giorni dopo. Sono tutte parte della risposta specifica.

I linfociti T-helper CD4+ si possono distinguere in sottopopolazioni, danno luogo a un profilo citochinico diverso. Non esistono dei marcatori di superficie che ci aiutino a distinguerli, si distinguono sulla base delle citochine prodotte:

- **Cellule di tipo Th1:** producono citochine in grado di attivare i macrofagi e i linfociti T citotossici. Sono importanti nella risposta autoimmune.

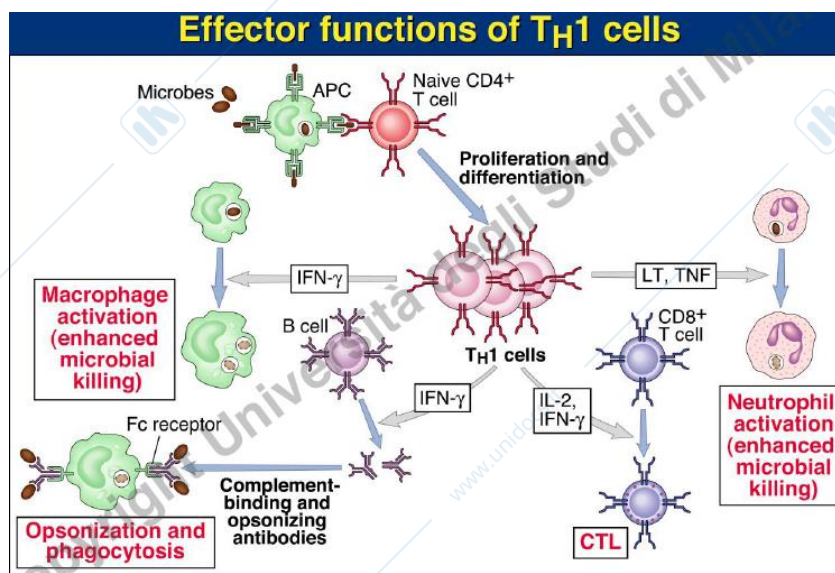
La loro polarizzazione è dovuta all'IFN- γ , che a sua volta è capace di produrre altre citochine come IL-12, è adibito alla difesa dell'ospite contro i patogeni intracellulari ed è presente nell'autoimmunità.

- **Cellule di tipo Th2:** producono citochine importanti per la risposta anticorpale. Si trovano nella difesa contro i patogeni extracellulari, gli elminti (vermi intestinali), allergie e asma. Il fattore che determina la loro polarizzazione è IL-4, queste Th2 esprimono il recettore per IL-4 e la stessa ma anche IL-5 e IL-13 che sono importanti per la produzione di anticorpi coadiuvando l'azione dei linfociti B. Anche loro si ritrovano nelle allergie e nell'asma.
- **Cellule di tipo Th-reg:** linfociti che si occupano di bloccare la risposta immunitaria, inibiscono e downregolano la risposta quando l'antigene è stato eliminato. TGF- β e IL-10 sono quasi sempre dei segnali inibitori quando interagiscono con il recettore su di una cellula.
- **Cellule di tipo Th17:** Producono IL-17, IL-23 e il suo recettore che sono citochine potenti nell'attivare una risposta anche contro i patogeni extracellulari, mediano l'infiammazione e l'autoimmunità e sono considerate "aggressive" perché la loro risposta è più forte di quella indotta da Th1.

Le popolazioni sono indistinguibili perché non esiste una differenza fenotipica, non sappiamo separare i linfociti T-helper con un marcatore come accade per separare CD3 e CD4 con i loro anti-anticorpi e usando dei magneti. Inoltre, le cellule in base all'ambiente dove si trovano sono capaci di produrre alcune citochine piuttosto che altre.

Le Th1 sono importanti nella risposta anti-microbica: riconosce l'antigene da un macrofago, esprime il peptide antigenico, attiva delle cellule *naive* specifiche che si attivano producendo citochine. La presenza di IFN- γ , prodotto dalle T-helper, fa differenziare le T-helper in tipo Th1 con IL-2 che partecipa alla proliferazione. IFN- γ contribuisce all'attivazione del macrofago

	Citochine che ne inducono il differenziamento	Situazione prevalente che ne induce il differenziamento	Principali citochine prodotte	Bersaglio principale	Effetto
Th1	IL-12 e IFN- γ	Risposta a patogeni intracellulari che attivano cellule dendritiche, macrofagi e NK	IFN- γ	Macrofagi Linfociti B Linfociti TH	Attivazione risposta infiammatoria cellulare Scambio isotipico Stimola lo sviluppo Th1 e inibisce Th2 o Th17
Th2	IL-4	Elminti e allergeni	IL-4 IL-5 IL-13	Linfociti B Linfociti TH Eosinofili Macrofagi Tratto GI	Sintesi IgE Indirizza verso Th2 Prolif, differ, attivaz Attivazione alternativa Peristalsi+ secrezione muco
Th17	IL-6, IL-1, IL-23	Batteri e funghi che attivano DC	IL-17 IL-22	neutrofili	Reclutamento Produzione altre citochine infiammatorie e di sostanze anti-microbiche
T reg			IL-10 TGF- β	linfociti T	Inibizione attivazione e funzioni effettrici Tolleranza periferica



e quindi a una maggiore fagocitosi e una produzione di radicali liberi dell'ossigeno per uccidere il patogeno endocellulare. Inoltre, fa attivare e proliferare le CD8+ (che diventano CTL), produce il TNF e la linfo tossina che attivano i neutrofili (attività antimicrobica) e può succedere che le Th1 intervenga sulla produzione di anticorpi anti IgG, quelli più in grado di attivare il complemento ed arrivare all'uccisione del patogeno. Lo scopo finale è sempre quello di uccidere il patogeno intercellulare e si ottiene sia attivando le cellule dell'immunità innata che attivando i linfociti citotossici.

Le Th2 possono essere attivate da patogeni, la citochina che più orienta le Th2 è l'IL-4 (prodotta da loro stessi), che porta alla produzione di IgE da parte dei linfociti B. C'è anche IL-5 e IL-4, ma soprattutto un'attivazione di eosinofili per rispondere ad allergie e l'uccisione di elminti. Le cellule Th2 regolano prevalentemente una risposta anticorpale.

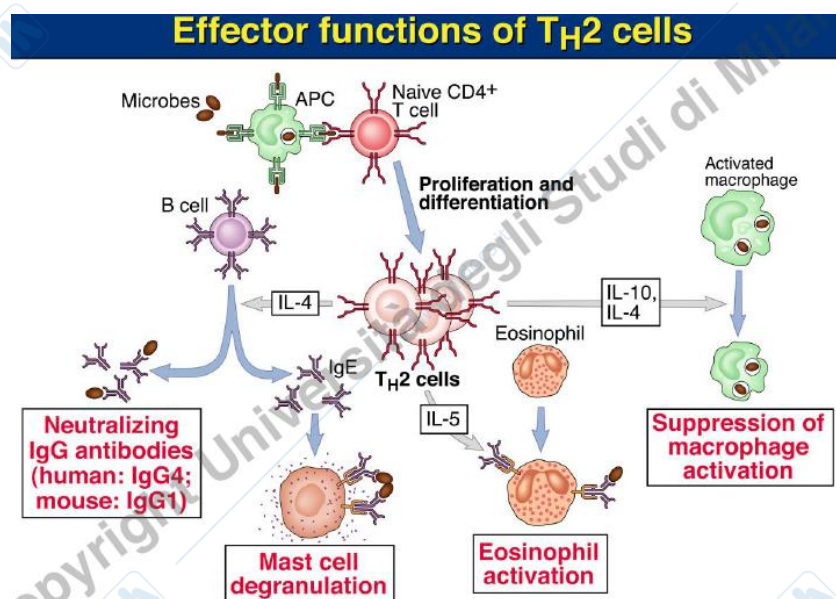
Alcune patologie su base immunologica si basano sull'errato tipo di risposta che l'organismo attiva. In malattie autoimmuni come l'artrite o il diabete di tipo 1 si ha l'attivazione di linfociti di tipo Th1 arrivando ad un danno tissutale di tipo citotossico. Nell'artrite la risposta immune distrugge cartilagine e ossa. Nel lupus eritematoso sistemico invece vengono prodotti molti anticorpi diretti contro specificità endogene come il DNA, le proteine istoniche o l'RNA e c'è uno squilibrio nella popolazione Th2 la quale induce anticorpi. C'è una sregolazione nella produzione di autoanticorpi.

Se noi usiamo IL-4 nel lupus essa è dannosa, non conoscendo l'equilibrio Th1 e Th2 si possono avere danni: nella sclerosi multipla (patologia demielinizzante) si pensava che dare IFN- γ fosse inibente poi ci si rese conto che questo invece accelerava la patologia.

Ancora più caratteristica in alcune infezioni è la risposta che l'organismo può sviluppare. A seguito di infezione da Leishmania (endocellulare, finisce nei macrofagi) si vide che due ceppi diversi di topo resistevano in modo diverso: il primo ceppo che produceva Th2 moriva, mentre il secondo produceva Th1 e

quindi IFN- γ che permette di resistere all'infezione.

Quando si attiva una risposta Th1 alcune delle citochine sono inibitorie per Th2 e viceversa, quindi il concetto di regolazione è insito nelle T-helper. Questo rende difficile una regolazione dall'esterno, perciò quando abbiamo una polarizzazione (un'infezione) molto forte dobbiamo inoculare più citochina antagonista per poter inibire risposta.



la

Sia nella risposta di tipo cellulare che in quella di tipo helper, dopo aver avuto l'espansione della popolazione Th1, Th2 e CTL e la downregolazione della risposta rimangono sempre delle cellule di memoria. Dopo la risposta primaria abbiamo cellule effettrici e una parte di cellule di memoria che si amplifica a seguito di altre risposte secondarie e terziarie. I linfociti di memoria sia T che B sono simili alle cellule staminali perché sono capaci di autoreplicarsi anche in assenza dell'antigene che le ha stimulate. Si replicano probabilmente a livello dei linfonodi e della milza, si stima ogni due settimane. Alcune di esse dipendono da citochine per sopravvivere e crescere, è ovvio perché ci devono essere dei fattori di crescita e di regolazione.

L'unica di cui ora conosciamo l'esistenza è IL-15 che serve a mantenere la memoria dei linfociti T citotossici. La vaccinazione contro la Rosolia, ad esempio, produce linfociti di memoria che ci

impediscono di ammalarci perché si riattivano vedendo l'antigene. Anche in assenza di questo antigene sono presenti e si duplicano, per molti anni fino a 10-30 anni. Nell'adulto si stima che ci siano pochi linfociti *naive* e che la maggior parte siano linfociti di memoria (che si attivano all'occorrenza). Questa è definita memoria centrale, diversa dalla memoria effettiva rappresentata dalla plasmacellule di memoria (terminalmente differenziate) che si mantengono e producono anticorpi per tutta la vita nel midollo osseo, poche stanno nei linfonodi.

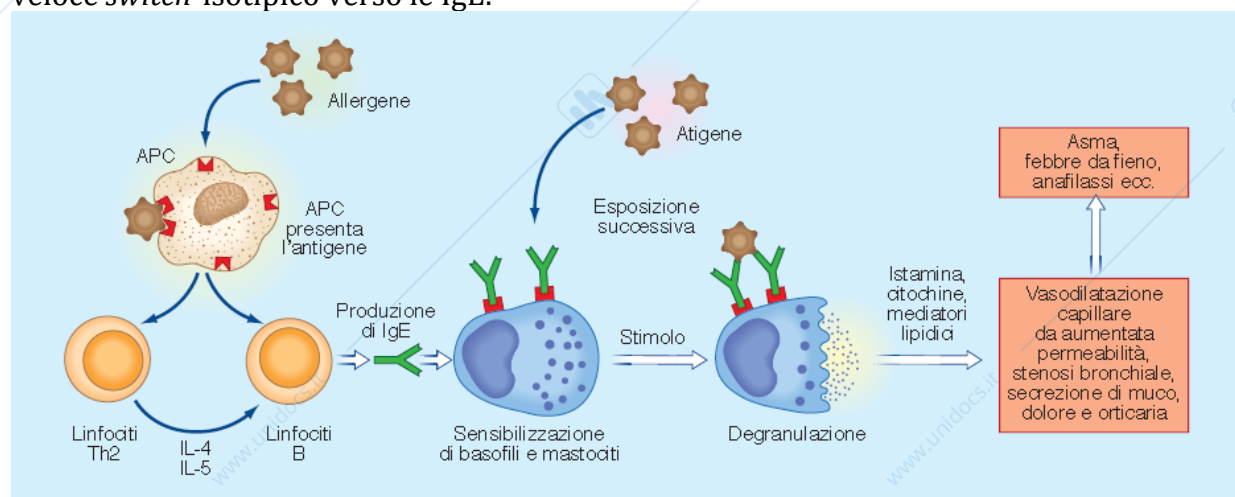
IMMUNOPATOLOGIA

L'ipersensibilità è una risposta immune esagerata contro stimoli che solitamente non sono tossici. Il termine è complessivo perché a seconda del tipo di cellule che intervengono può portare a lesioni tissutali di tipo diverso, parliamo di malattie perché il sistema immune ci difende causando dei danni all'organismo. Le reazioni di ipersensibilità si distinguono in 4 tipi:

- Tipo I: ipersensibilità immediata. Caratteristica delle allergie, ha come meccanismo patogenetico gli anticorpi per le IgE. Causano danni cellulari attraverso i mastociti e i loro mediatori come le amine vasotattive, le citochine e i mediatori lipidici.
- Tipo II: risposta dannosa per l'organismo mediata da anticorpi citotossici come le IgG e le IgM che riconoscono antigeni cellulari. Il danno avviene attraverso l'opsonizzazione e la fagocitosi, oltre al reclutamento ed attivazione di leucociti (neutrofili, macrofagi) ad opera del complemento e dei recettori Fc.
- Tipo III: il meccanismo del danno è lo stesso dell'ipersensibilità di tipo II, ma riconosce antigeni solubili a cui si legano dando complessi, si dice anche mediata da immunocomplessi.
- Tipo IV: mediata dai linfociti T, coinvolge delle cellule perciò è detta risposta cellulo-mediata. E' detta anche ipersensibilità di tipo ritardato (coinvolge linfociti T CD4+) perché rispetto a quella immediata richiede 24-48 ore da quando si è visto l'antigene. Abbiamo un'attivazione macrofagica e un'inflammatione mediata da citochine, ma non è l'unico meccanismo in quanto possiamo avere una citolisi mediata da linfociti T (CTL CD8+) in cui manca l'attivazione macrofagica (c'è sempre l'inflammatione mediata da citochine). E' l'unica risposta cellulare non mediata da anticorpi.

La risposta immune nei soggetti allergici è una risposta a fattori ambientali che sono innocui. Gli allergeni sono molecole a basso peso molecolare, glicosilate e molto solubili nei fluidi corporei. Possono essere: escrementi di acari, aspergilli (muffe negli ambienti umidi le cui spore causano allergie), alimenti, erbe, farmaci, insetti e veleni, pollini di graminacee e parassiti.

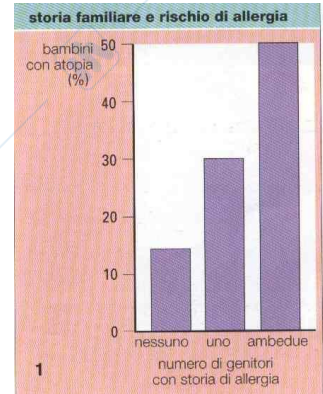
L'allergene penetra nell'organismo e produce una fase di sensibilizzazione: produce una risposta immune di tipo Th2 per cui vengono prodotte IL-4 e molte IgE. Questa prima fase è del tutto asintomatica. La fase di sensibilizzazione coinvolge il linfocita B che lega un allergene, viene processato e riportano in superficie. IL-4 viene prodotta, attiva i linfociti B che diventano plasmacellule e la risposta primaria produce le IgM, ma il fatto che ci sia molta IL-4 porta ad un veloce *switch*-isotipico verso le IgE.



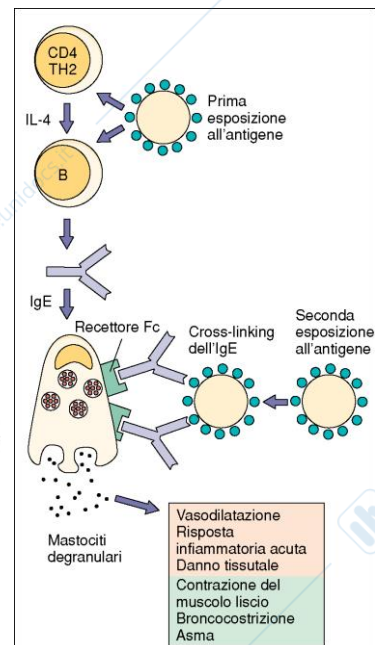
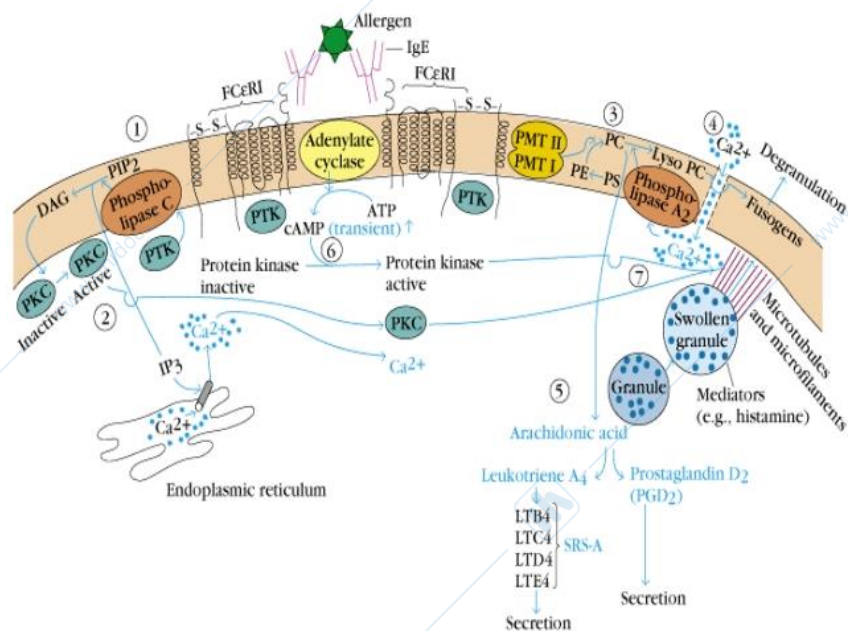
Fase di manifestazione allergica: Le IgE circolanti sono poche ma hanno la capacità di legarsi con la loro porzione costante (Fc) ad un recettore specifico sulla superficie dei mastociti o degli eosinofili circolanti. Le IgE legate al mastocita legano il nuovo antigene, questo fa un cross-link ovvero lega più mastociti che degranulano (contengono granuli di istamina) rilasciando i mediatori rapidi, l'istamina ad esempio, vengono prodotte le prostaglandine e i leucotrieni (derivati dall'acido arachidonico). Come risposta tardiva abbiamo la produzione di citochine. Si attivano i meccanismi di risposta acuta, solo che la degranolazione è indotta dall'allergia.

Una volta che la persona è sensibilizzata, abbiamo cellule di memoria che portano ad un picco di produzione di IgE dopo l'esposizione all'allergia.

La sintomatologia è diversa a seconda del distretto anatomico interessato, ovvero dal sito di contatto con l'allergene. La reazione immediata è mediata da istamina e le reazioni tardive sono date dalla produzione di citochine, IL-4 ma anche la risposta infiammatoria acuta. Le IgE sono glicosilate, monomeriche, hanno 3-4 domini costanti nella catena costante, nella porzione Fc hanno i siti di legame per l'antigene. Nel sangue sono pochi, ne abbiamo 1 mg/mL, le IgG sono di circa 10 mg/mL.



Le cause di allergia possono essere ambientali oppure genetiche, la possibilità che i figli siano allergici è aumentata, se un genitore è allergico ho il 30% in più delle possibilità mentre se entrambi i genitori sono soggetti allergici allora avremo il 50%. Questo perché il MHC che si occupa di presentare il peptide derivato dall'allergene è codificato dai geni DR, DQ e DC sia da alleli paterni che materni. Le allergie sono quindi familiari, non ereditarie: la trasmissione non è diretta perché può esserci *crossing-over*, gli alleli possono essere polimorfi, non tutti sono trasmessi ai figli e ciascuno di noi processa in modo diverso



La degranolazione dei mastociti è mediata dal legame con l'allergene, le IgE attivano la trasmissione del segnale: attivano le MAP chinasi citoplasmatiche che a loro volta attivano le PLA2, viene attivato l'acido arachidonico e secreti leucotrieni e prostaglandine. Le chinasi fanno sì che vengano attivati fattori trascrizionali che amplificano la risposta infiammatoria. L'attivazione a livello di membrana porta alla liberazione di IP3 che permette la fuoriuscita di calcio dal reticolo endoplasmatico che favorisce la fusione delle vescicole contenenti istamina. L'istamina si lega a recettori H1 espressi sulla muscolatura liscia causandone la contrazione se è muscolatura liscia bronchiale o vasodilatazione se siamo a livello della muscolatura vasale, con

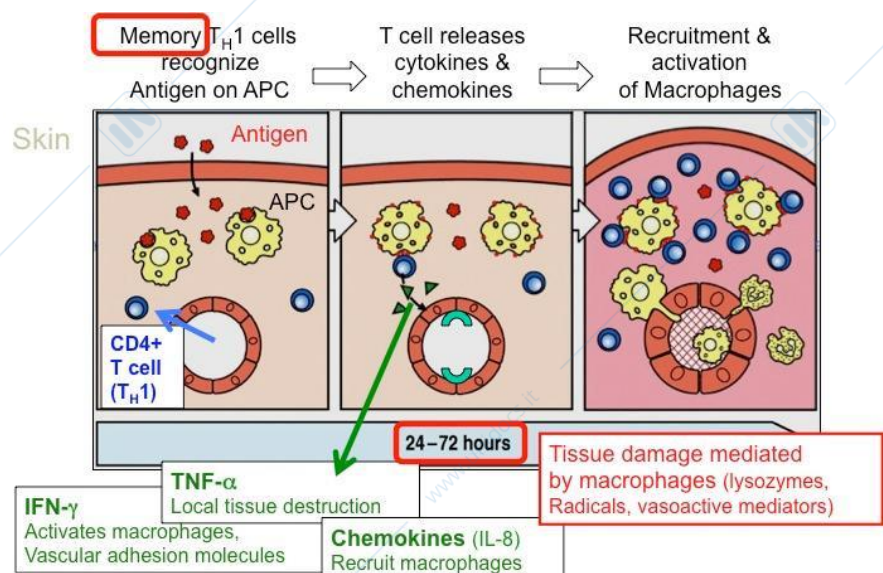
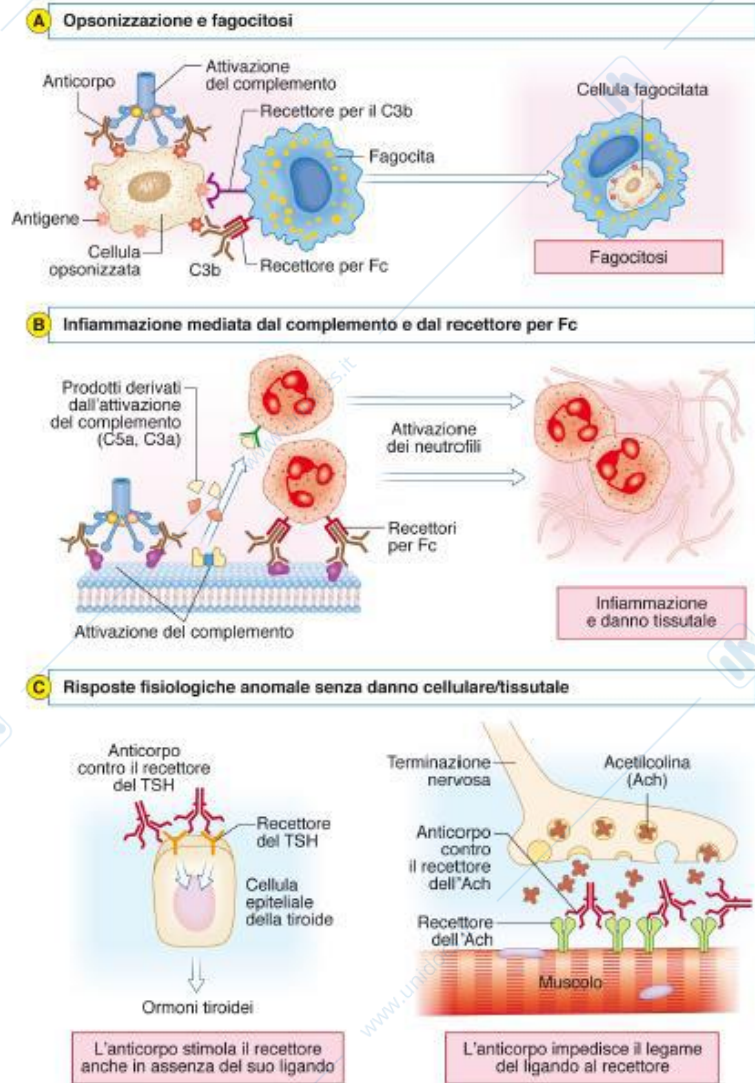
formazione di edema e secrezione di fluidi. A livello intestinale aumenta la peristalsi e possiamo avere l'attivazione tardiva di diverse citochine che instaurano un processo di infiammazione cronico. L'asma e le allergie possono diventare croniche perché le reazioni vanno a sovrapporsi in quanto l'esposizione può essere continua.

La sintomatologia a livello cutaneo porta ad arrossamento, prurito, gonfiore e vasodilatazione. C'è un'attivazione immediata dei mastociti, formazione di edema, congestione e formazione del gonfiore superficiale.

La reazione della mucosa inalatoria porta ad una febbre da fieno (stimolata dai pollini), la mucosa diventa edematosa, c'è infiltrato leucocitario, secrezione abbondante di muco e l'essudato non è purulento, ci sono poche proteine all'interno. L'eccesso di starnuti e tosse può portare alla dispnea (mancanza di respiro). Si può avere in concomitanza una congiuntivite allergica.

La manifestazione più grave è l'asma, malattia a carattere episodico, che si verifica quasi sempre per inalazione dell'allergene (atopico), ma può anche scatenarsi in modo non atopico se fa freddo, si fa sforzo fisico e se ci sono infezioni virali soprattutto nel caso di persone anziane. L'asma è una malattia a patogenesi multifattoriale molto diffusa (2-4% della popolazione). Nell'asma l'effetto dell'accumulo di muco, della broncocostrizione con il tempo determina un danno al bronco stesso che risponde con una reazione di ispessimento e si rafforza. Rende ispessita la membrana basale, ipertrofizza la muscolatura liscia, aumenta la vasodilatazione, l'epitelio si desquama e abbiamo un edema della mucosa e sottomucosa con infiltrazione di eosinofili e neutrofilo. C'è inoltre un'iperplasia delle ghiandole mucose e la formazione di un tappo di muco.

Le allergie alimentari derivano da proteine contenute negli alimenti, i sintomi sono intestinali e ci può essere anche orticaria a livello



cutaneo. L'allergene attraversa la parete epiteliale dell'intestino e si lega alle IgE sui mastociti della mucosa e della sottomucosa gastroenterica. A differenza delle intolleranze alimentari, le allergie alimentari non dipendono dalla quantità di alimento ingerito in quanto si scatena una sintomatologia entro pochi minuti dall'assunzione e non sono presenti disfunzioni dell'apparato digerente.

L'aspetto più grave e acuto (che può portare anche a morte) si ha quando l'allergene penetra nel torrente circolatorio. E' il caso di allergie a veleni animali o a farmaci, i contatti successivi a questi allergeni sviluppano uno shock anafilattico. Il contatto con l'allergene è sistemico e quindi lo sarà anche la reazione, si attivano tutti i mastociti in circolo: aumenta la permeabilità vasale in tutto il corpo, la pressione sanguinea si abbassa, le vie aeree si costringono, aumenta la peristalsi e la secrezione di muco. La reazione può essere controllata con l'iniezione di adrenalina (epinefrina) che riduce la permeabilità vasale e stimola il cuore aumentando la gittata cardiaca.

5/04/2016

Diagnosi di allergia

- 1) Si guarda l'anamnesi (sintomi che la persona manifesta) e si fanno test cutanei:
 - ✓ *Prick test*: per diagnosi di allergie respiratorie e alimentari. Viene usato per verificare se un allergene provoca infiammazione allergica con meccanismo immediato, ovvero mediato da IgE.
 - ✓ *Patch test*: per verificare se una sostanza provoca infiammazione allergica con meccanismo ritardato, ovvero cellulo-mediato.
- 2) Si dosano le IgE totali che aumentano in una persona allergica rispetto ai valori normali (soprattutto se viene esposta all'allergene) tramite il *Prist test*. In seguito si fa il *Rast test*, ovvero il dosaggio specifico dell'allergene una volta che esso è stato individuato.
- 3) Test di provocazione specifici e test di esposizione orale. Viene fatto principalmente per l'asma, si fa in ospedale perché deve essere ben controllato.

Terapia

Ci sono parecchie terapie, non del tutto risolutive ma sintomatiche:

- Prevenzione: non è una terapia.

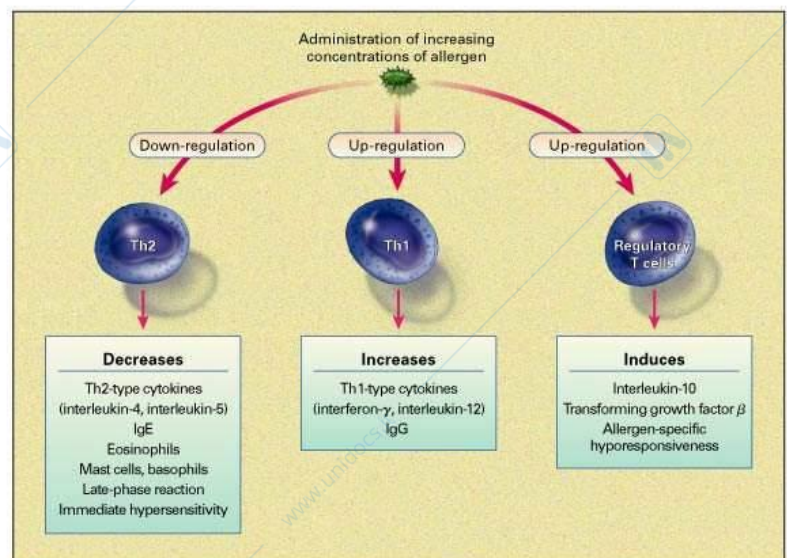
- Terapia farmacologica che può avere due scopi:

1. Ridurre infiammazione: agiamo con farmaci anti-infiammatori (es. corticosteroidi), che hanno la funzione di ridurre la produzione di citochine e quindi placare la risposta infiammatoria.
2. Ridurre sintomatologia: antistaminici o bronco-dilatatori (es. *Ventolin*).

- Terapia immunologica

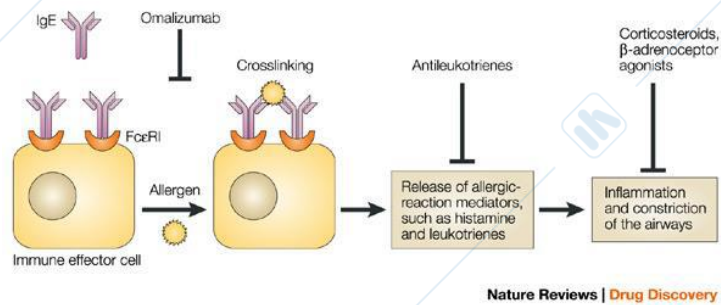
A. Terapie desensibilizzanti.

Chiamate anche vaccini, sono in realtà successivi inoculi di piccole dosi di allergene, volte a ridurre la produzione di IgE, ridurre risposta Th2 (che è quella della IgE) e aumentare Th1 (IgG). Si fa in modo che l'organismo diventi tollerante all'antigene, si cerca di deviare la risposta immune di tipo IgE (stimolata da IL-4) lasciando che rispondano le IgG che non causano la sintomatologia. La durata del



trattamento è di circa 3-4 anni, l'assunzione è giornaliera e solo in alcuni mesi dell'anno (stagionale).

- B. **Anticorpi monoclonali anti-IgE:** neutralizzano ed eliminano IgE. **Omalizumab:** è un anticorpo monoclonale, che è stato indotto contro le IgE. Lega le IgE circolanti in un individuo e gli impedisce di legarsi al recettore, ma lega anche le IgE sui mastociti, impedendo il contatto con l'antigene. Il vantaggio è che oltre alla sintomatologia ridotta, diminuisce anche il numero di linfociti B di memoria fino quasi a scomparire. Se non ci sono linfociti di memoria il soggetto è praticamente insensibile all'allergia.



più

Altri tipi di ipersensibilità

Le malattie da ipersensibilità sono classificate in 4 categorie, a seconda del meccanismo immunologico prevalente:

- Tipo I: ipersensibilità immediata (o allergia).
- Tipo II: anticorpi di tipo citotossico che riconoscono le cellule che esprimono l'antigene e le eliminano, tramite il complemento o la fagocitosi.
- Tipo III: reazione contro antigeni solubili che formano immunocomplessi.
- Tipo IV: ipersensibilità ritardata o cellulo-mediata.

Ipersensibilità di tipo II (o citotossicità anticorpo-dipendente)

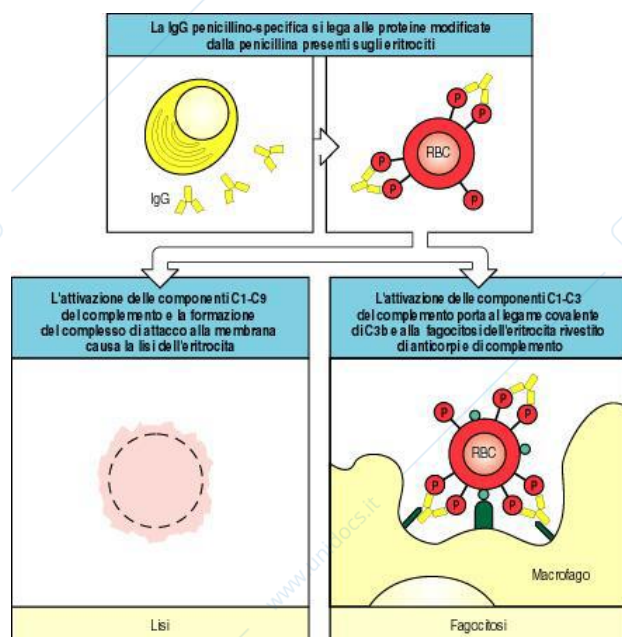
Abbiamo un anticorpo di classe IgG o IgM che riconosce un antigene self o antigeni estranei che si trovano sulla superficie cellulare (assorbiti). Sono reazioni legate a patologie.

La reazione Ag-Ab può provocare:

- **Danno tissutale**, che uccide la cellula bersaglio tramite l'attivazione del sistema del complemento.
- **Opsonizzazione e fagocitosi**: attività tossica che è mediata da anticorpo che con porzione Fc si lega al fagocita e la cellula viene uccisa.
- **Interferenza** con le normali funzioni tissutali. Se un tessuto viene distrutto da una risposta immunitaria, le sue funzioni saranno ridotte o perse.

Esempi di reazioni di tipo II sono:

- ✓ Reazioni a farmaci: la penicillina ad esempio si può legare ai globuli rossi; il globulo rosso così modificato viene riconosciuto come cellula estranea, quindi si formano anticorpi contro questa cellula. Gli anticorpi lisano i globuli rossi e si va incontro ad anemia emolitica.
- ✓ Reazioni da trasfusione: incompatibilità AB0. Gli anticorpi naturalmente presenti nel nostro organismo riconoscono il sangue estraneo come non self. Sono reazioni mediate da anticorpi citotossici.



- ✓ Incompatibilità materno-fetale: fattore Rh(resus, scoperto su globuli rossi di una scimmia da Landsteiner nel 1940).
Non tutti esprimono questo fattore: nel caso che una madre Rh- concepisca un figlio Rh+ non succede nulla durante tutta la gravidanza, ma al momento del parto c'è un mescolamento del sangue di madre e neonato e ciò provoca una risposta anticorpale. Non succede nulla al primo figlio perché la madre non è sensibilizzata, diventa problematico per il secondo figlio che subito dopo la nascita rischia di andare incontro alla malattia emolitica nel neonato perché gli anticorpi della madre lisano globuli rossi del neonato.
Prima del parto o di un aborto, le donne Rh- vengono trattate con anticorpi preformati anti-Rh nelle rime 24 ore dopo l'evento, che bloccano l'antigene prima che avvenga la sensibilizzazione.
- ✓ Malattie autoimmuni, ad esempio le iper-tiroiditi o a Miastemia Gravis(gli anticorpi agiscono sul recettore dell'Ach e impediscono di trasmettere il segnale).

Ipersensibilità di tipo III(o ipersensibilità da immunocomplessi)

La differenza con ipersensibilità di tipo II è che questi antigeni riconoscono antigeni solubili (invece di antigeni cellulari). Si manifestano patologie diverse perché si manifestano gli immunocomplessi.

Gli immunocomplessi sono legami tra anticorpi di classe IgG, IgM e antigeni solubili. Solitamente si formano sempre e spontaneamente al riconoscimento di una proteina o una tossina batterica. Sono di piccole dimensioni(monomerici) e vengono eliminati tramite milza, catturati dai globuli rossi. C'è un sistema di clearance continuo di questi immunocomplessi.

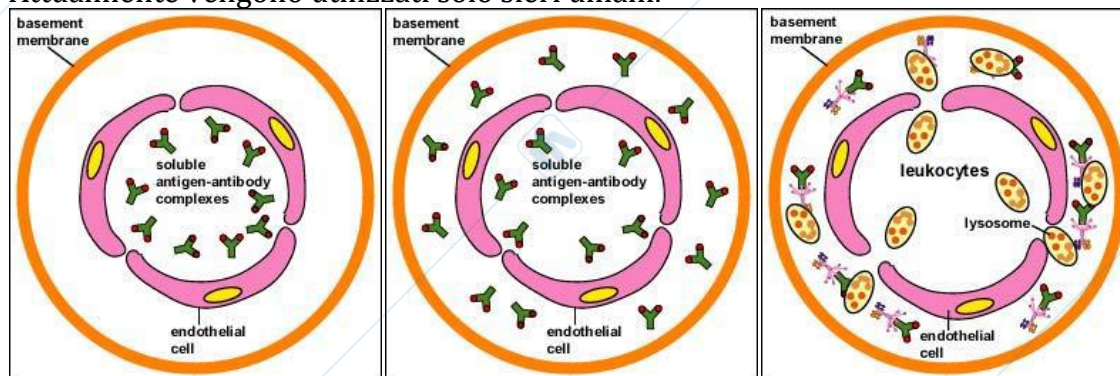
Nel caso in cui siano più grossi, invece, gli immunocomplessi possono precipitare in diversi settori e attivare la risposta infiammatoria. Si manifestano a livello capillare, anche glomerulare. Possono manifestarsi, ad esempio, come vasculiti(infiammazione della parete basale), glomerulopatie, polmoniti, artriti ed eritemi.

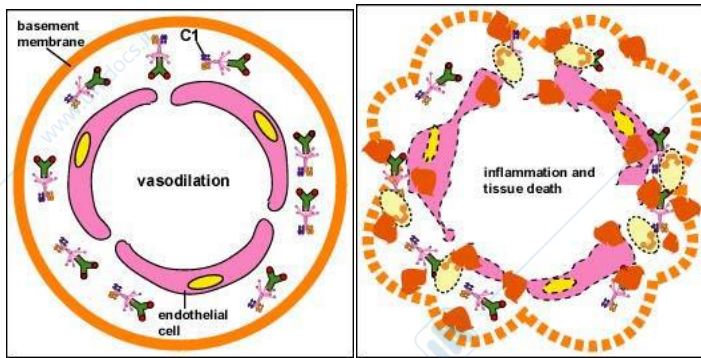
Vasculiti

Gli immunocomplessi circolanti si depositano a livello capillare, si attiva il complemento, la fagocitosi da parte dei neutrofili, prodotte le citochine infiammatorie con conseguente infiammazione della parete basale. Se il danno è superficiale abbiamo una zona cutanea arrossata, gonfia, calda e dolorosa.

Malattia da siero

Scoperta alla fine del XIX nel rischio di infezione tetanica(ma anche difterica), ad esempio, veniva utilizzato il siero di cavallo che si sensibilizza bene e produce tanto siero da essere un farmaco. Nonostante le purificazioni, i pazienti producevano anticorpi contro alcune proteine di cavallo. Attualmente vengono utilizzati solo sieri umani.





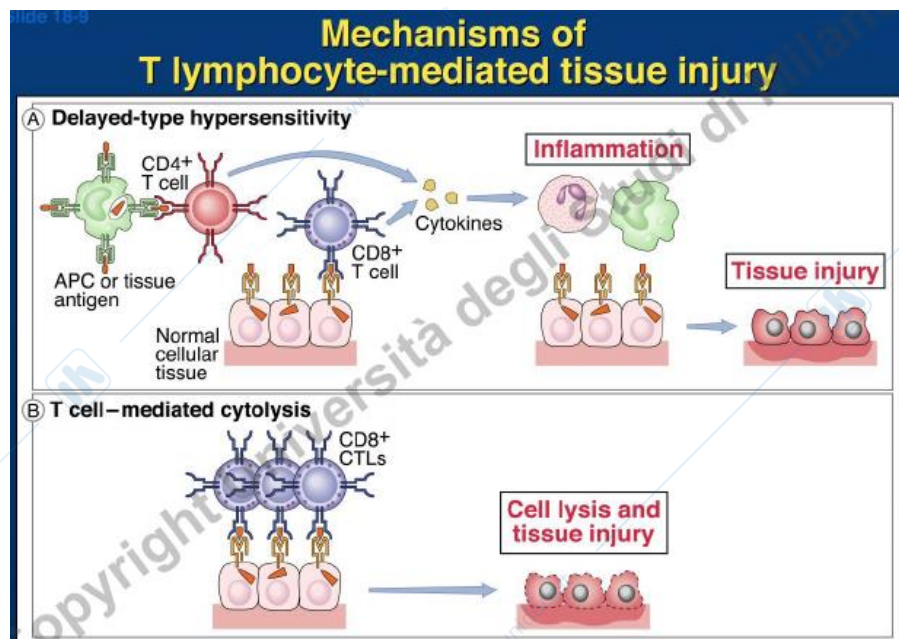
Ipersensibilità di tipo IV

Si differenzia dalle altre perché, invece di avere anticorpi contro antigeni, ci sono delle cellule. Viene detta reazione ritardata perché, in seguito a successivi contatti con antigeni, la reazione richiederà 48-72 ore per avvenire, tempo necessario per reclutare le cellule. La reazione è mediata da cellule T e Th. Questa sensibilità non è trasferibile mediante il siero, perché nel siero non sono presenti cellule (precipitano durante la coagulazione).

Il siero contiene tutta la frazione solubile, differisce dal plasma:

Il siero si ottiene dopo coagulazione, mentre il plasma separa elementi figurati del sangue, ma senza che avvenga coagulazione. Per ottenere il siero uso anti-coagulanti.

Questa forma di ipersensibilità (DTH in inglese, *delayed-type hypersensitivity*) danneggia i tessuti attraverso le citochine.



Diagnosi per l'ipersensibilità di tipo IV

Test alla tubercolina: vengono inoculati sotto cute degli antigeni associati ai micobatteri della tubercolosi. Se una persona ha ricevuto vaccino o è stata esposta alla tubercolosi, dopo 72 ore sviluppa un eritema nella zona dove sono stati inoculati gli antigeni. La reazione cutanea è diversa dalla reazione allergica, la lesione è rigida e abbiamo un vero e proprio eritema. Una volta veniva fatta come screening alla popolazione infantile.

Varianti ipersensibilità di tipo IV:

Ipersensibilità da contatto: correlata agli ioni metallici (Ni, Co, Cr). Diagnosticata con *Patch test*. Il nichel si lega ai globuli rossi, diventa un aptene riconosciuto come estraneo e quindi attiva la risposta immunitaria con sviluppo di un eritema. Il nichel si trova soprattutto nella bigiotteria, ma è contenuto in tutte le leghe di metallo.

Cobalto e cromo sono presenti nel cemento, chi lavoro nell'edilizia rischia di esserne fortemente sensibilizzato.

Enteropatia glutine-sensibile (granulomatosa): la gliadina del glutine è l'antigene, attiva i linfociti.

Ipersensibilità tipo-ritardata (tubercolinica): il veleno di insetto e le proteine dei micobatteri sono gli antigeni.

MALATTIE AUTOIMMUNI

L'autoimmunità è dovuta a reazioni di ipersensibilità in cui il danno tissutale è dovuto all'attività degli anticorpi o dei linfociti citotossici. La risposta immune viene indotta contro degli antigeni autonomi, gli antigeni del self dell'individuo che vengono riconosciuti erroneamente.

Sono malattie che colpiscono il 3-5% della popolazione, solitamente sopra i 50 anni. Il diabete giovanile che si sviluppa intorno ai 12-15 anni è un'eccezione. Queste malattie sono:

- Progressive e croniche, perché l'antigene non può essere eliminato.
- Possono essere malattie organo-specifiche o tessuto sistemiche, dipende dalla diffusione dell'antigene. Le tiroiditi, ad esempio, hanno danno immunologico limitato alla tiroide: ci sono conseguenze sistemiche, ma il danno è localizzato. In malattie come artrite reumatoide o il lupus eritematoso sistemico abbiamo delle reazioni diffuse a tutto l'organismo perché l'autoantigene è diffuso in più distretti. Nell'artrite reumatoide gli antigeni si trovano a livello delle articolazioni e della cartilagine. Il LES ha autoanticorpi diretti contro il DNA, le proteine istoniche e l'RNA. Il DNA è un forte immunogeno essendo legato a molte proteine istoniche. Il fatto di avere autoanticorpi sono proteine solubili che formano immunocomplessi e danno le classiche manifestazioni come gli eritemi, le vasculiti e le nefriti ecc.
- C'è una forte predominanza di suscettibilità nel sesso femminile rispetto a quello maschile, non si sa il motivo. Ciò è evidente dai dati epidemiologici, nel LES si arriva per alcune fasce di età a 20:1.

Non conosciamo le eziologie di queste malattie autoimmuni ma dalle analisi sappiamo che c'è familiarità e l'associazione di alcuni alleli dell'HLA. E' l'autoantigene che deve essere opportunamente presentato dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità o di classe I o di classe II. Per avere una buona presentazione occorre avere un adeguato allele che determina il riconoscimento di questi antigeni.

Gli alleli coinvolti (eccetto nella spondilite) sono di classe II codificati o da loci DR o dai loci DQ, c'è un rischio relativo perché una persona che esprime l'allele DR4, ad esempio, ha 9 volte più rischio di sviluppare artrite reumatoide rispetto a chi non esprime questo allele. Il diabete giovanile è associato con DR3 e DR4 aumentando il rischio di 5 volte, se poi i due alleli sono eterozigoti DR3/DR4 il rischio si moltiplica aumentando di 25 volte. DQ2 e DQ8 associati alla malattia celiaca, sono necessari ma non sufficienti a sviluppare la celiachia. Questi due fattori aumentano il rischio relativo di 30 volte. Ci sono anche fattori ambientali che influenzano l'insorgere di queste patologie.

Malattia	Allele HLA	Rischio relativo*
Artrite reumatoide	DR4	9
Diabete mellito insulino-dipendente	DR3 DR4 Eterozigosi DR3/DR4	5 5-6 25
Sclerosi multipla	DR2	4
Lupus eritematoso sistemico	DR2/DR3	5
Malattia celiaca	DQ2/DQ8	30
Spondilite anchilosante	B27	90-100

Le ipotesi di insorgenza di malattie autoimmuni sono che i meccanismi di induzione o mantenimento della tolleranza vengono meno. Gli errori possono essere dovuti da situazioni endogene o da contatti con l'ambiente esterno.

La tolleranza immunologica dagli studi che sono stati fatti si può suddividere in:

- Una tolleranza centrale per cui l'induzione di tolleranza avviene a livello degli organi linfoidi primari: timo per i linfociti T e midollo per i linfociti B. Nel timo ci sono solo pro-timociti, a differenza del midollo che ha anche precursori di mieloidi e eritrociti. Ciò ha reso più semplice studiare questo fenomeno nel timo. Inoltre il timo è un organo più facilmente nucleabile nell'animale, è una superficie più accessibile.
- Una tolleranza periferica;

La tolleranza centrale parte dai linfociti maturi e durante questa fase di maturazione i linfociti attraversano degli stadi per acquisire il recettore.

Alla fine hanno un recettori, delle catene variabili e anche altre molecole di adesione che gli consentono di ancorarsi bene.

A livello degli organi linfoidi primari (del timo soprattutto) si possono sviluppare dei linfociti specifici per l'antigene non self che quindi migrano in periferia, ma anche dei recettori per il non-self che muoiono nel timo stesso per la maggior parte. Questo

meccanismo di selezione timica è il meccanismo di tolleranza centrale.

Studiando la cellularità del timo di topo, si è visto che questo non varia molto, produce da $1-2 \times 10^8$ timociti, guardando ai pro-timociti invece si è calcolato che al giorno ne arrivano 50 milioni (5×10^7). Ogni giorno però dal timo escono 2 milioni di linfociti T e il timo non cresce, raddoppierebbe ogni giorno, ma non è così perché più del 98% delle cellule che arrivano al timo muoiono qui senza indurre infiammazione, si ha infatti una morte per apoptosi. Il fenomeno apoptotico è stato scoperto proprio facendo sezioni di timo in topi neonati, alla nascita il timo è ancora molto immaturo.

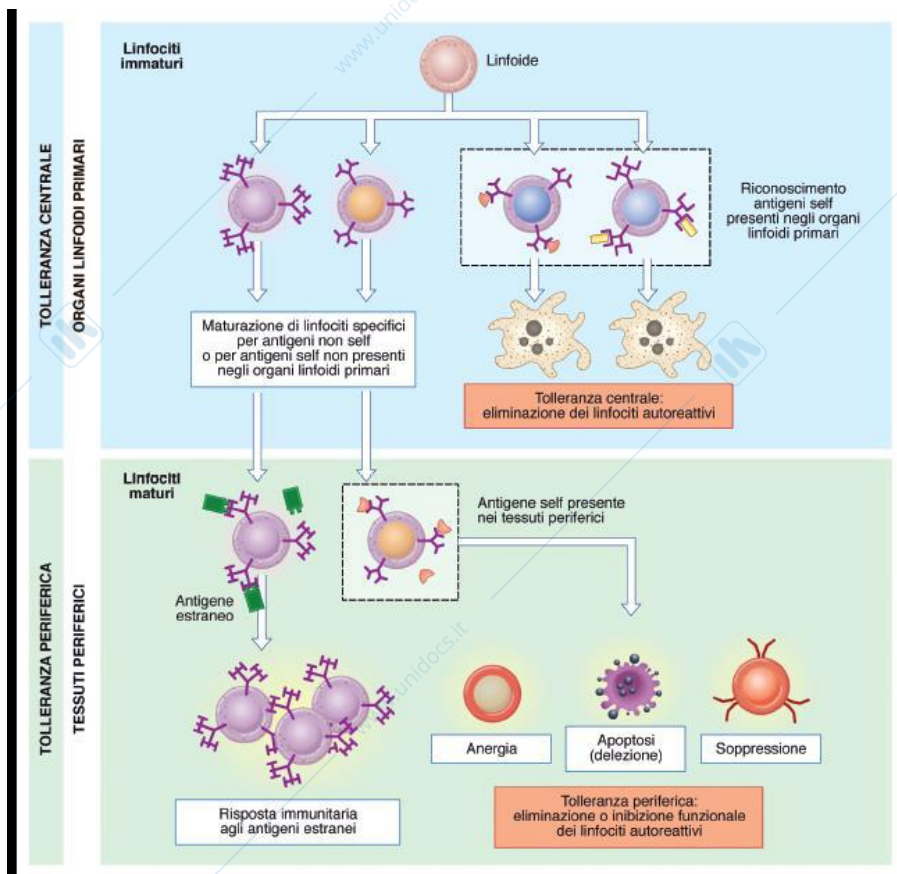
Indagando il fenotipo, cioè l'espressione delle molecole di superficie, si è potuto notare che ci sono due fenomeni nel timo:

- **Selezione positiva:** sopravvivono quei timociti che man mano che proliferano producono un recettore che riconosce il MHC self. L'HLA self deve essere legato da un linfocita altrimenti non si forma la triade recettore-linfocita-LHA, quindi il peptide non viene presentato bene. Quindi qualsiasi recettore prodotto che non può legare il recettore viene eliminato perché non è utile.
- **Selezione negativa:** gli autoantigeni che vengono presentati dai macrofagi timici anziché indurre l'attivazione dei linfociti ne induce la morte soprattutto se la concentrazione dell'antigene self nel timo e l'affinità per il recettore sono molto elevate.

Il riarrangiamento delle regioni geniche che attivano la regione variabile è del tutto casuale quindi possono essere prodotti recettori a bassa o ad alta affinità per l'antigene self.

I linfociti che esprimono poca affinità per l'HLA vanno in apoptosi ancora prima di proliferare, sono il 90%. I linfociti che esprimono recettori in grado di legare ad alta affinità gli antigeni self che transitano nel timo muoiono per apoptosi.

Il livello di affinità per antigeni self non è zero, c'è il rischio che all'interno di quei linfociti (che non riconoscono bene antigeni self) ci si usano comunque dei linfociti con un recettore con un'affinità bassa per potenziali antigeni self. Una delle ipotesi più probabili è che i linfociti T che riconoscono antigeni self non presenti nel timo o presenti a bassa affinità sfuggono al timo e si ritrovano in periferia. La probabilità che ognuno di noi abbia linfociti poco reattivi in circolo c'è.



Il sistema non è infallibile. Se l'antigene self non transita mai nel timo, allora è possibile che non venga mai indotta tolleranza. Quindi quegli antigeni self che non sono presenti nel timo vengono riconosciuti in periferia.

Per questo abbiamo un sistema di tolleranza periferica.

I linfociti sfuggiti al sistema di tolleranza centrale, sono mantenuti in uno stato di tolleranza periferica attraverso diversi meccanismi:

- Uno di questi è l'**anergia clonale**: i linfociti incontrano l'antigene con bassa affinità e pur legandolo non si attivano perché mancano i fattori di co-stimolo. Se però vengono forniti si ha l'attivazione della risposta autoimmune.
- La **delezione clonale** (o apoptosi) è un altro di questi meccanismi, se questi potenziali linfociti autoreattivi incontrano il self a livello dei linfonodi (organi linfoidi solidi) possono ricevere un segnale apoptotico.
- Altrimenti si può avere un'**attiva soppressione** a cui prendono parte i linfociti T regolatori che producono citochine regolatorie importanti nel mantenere sotto controllo la tolleranza periferica.

La perdita di tolleranza può avvenire quando:

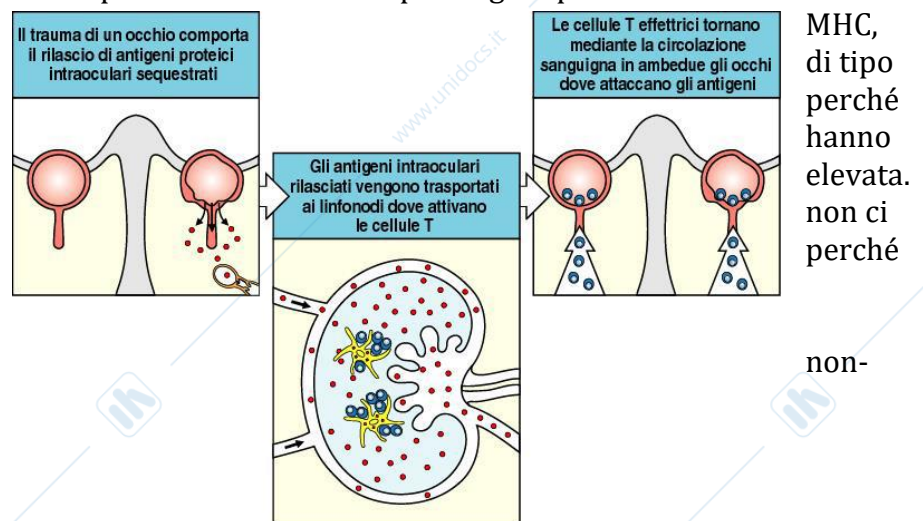
- Si **perde l'anergia** per la presenza di fattori co-stimolatori. A livello del linfonodo c'è una presenza di fattori di co-stimolo (sono solubili) quando abbiamo una risposta immune e vengono prodotte tante citochine, l'ambiente induce in modo anomalo la formazione di cofattori. All'insorgenza di una patologia autoimmune organo-specifica può seguire una patologia infettiva avvenuta a livello di quell'organo, a qualche mese di distanza. Questo indica che c'è stata una stimolazione anomala di linfociti potenzialmente auto-reattivi in concomitanza con un'infezione esogena, ovvero quando l'ambiente si è iper-attivato per altri motivi.
- La **perdita di linfociti T regolatori** in una fase di iper-attivazione per stimoli esogeni può comportare la diminuita soppressione.
- Il **rilascio di antigeni sequestrati**: non tutte le molecole self possono transitare nel timo durante la maturazione timica, ci sono dei distretti anatomici come la camera anteriore dell'occhio (cornea), i testicoli e la placenta che sono siti privilegiati perché non hanno vasi linfatici, non esprimono possono avere citochine inibitorie (non sappiamo le abbiano) e perciò un'attività soppressoria

Nel feto è importante che sia una risposta immune, i tessuti del feto sono riconosciuti dal sistema immunitario materno come self.

Il trapianto di cornea si fa regolarmente, anche tra consanguinei (e non da

cadavere) perché non essendoci vasi linfatici non c'è rigetto. **L'oftalmia simpatica** può succedere che per un trauma a un occhio si liberino tante proteine che normalmente non sono visibili al sistema immune (sono isolate) che vengono viste come estranee, possono indurre una risposta autoimmune a livello linfonodale. Simpatetica indica che viene indotta una risposta autoimmune anche nell'occhio che non ha subito il trauma.

- Un altro motivo per cui può insorgere una patologia autoimmune è il **mimetismo molecolare**. Esistono delle omologie tra le molecole dell'ospite (self) e gli antigeni estranei di



solito associati a un patogeno. Il peptide antigenico di 15-20 AA può venire dall'esterno(patogeno) ma essere anche abbastanza simile ad una molecola self. La celiachia è dovuta a questo fenomeno così come la febbre reumatica acuta. Questa patologia è una conseguenza(sequela) di un'infezione di streptococchi β -emolitici di gruppo A(gli stessi che causano le tonsilliti) che se non viene curata bene forma degli anticorpi contro la proteina M delle streptococco che cross-reagiscono con le proteine cardiache e di altre tessuti. Questi streptococchi causano pancreatidi che legano la proteina M nelle cellule miocardiche e pericardiche dando un'inflammatione citotossica da anticorpi. Se riconoscono le articolazioni, possono determinare la poliartrite migrante asimmetrica(75% dei casi), è la più comune soprattutto nei bambini. Gli streptococchi in questo caso non portano alla tonsillite però causano la riosita del sistema immune e quindi si determina la formazione di questi anticorpi che sono anche detti anticorpi anti-streptococchi lisini. La febbre reumatica o reumatite articolare è dolorante ed è "migrante" perché può interessare diversi siti anatomici anche molto distanti tra loro. Se la poliartrite diventa importante può portare alla distruzione della cartilagine con formazione degli ematriti, ovvero sangue nelle articolazioni che duole ed impedisce all'articolazione di muoversi.

A livello renale, anticorpi diretti contro lo streptococco ma che cross-reagiscono possono portare a delle nefriti. Sappiamo che nella febbre reumatica le sequenze della miosina umana e la parete dello streptococco contro la quale vengono indotti questi anticorpi anti-M una cross-reattività di sequenza sufficiente a che il determinante antigenico sia riconosciuto dagli stessi anticorpi. Altri determinanti che possono spiegare un mimetismo, come nella sclerosi multipla, sono linfociti che si attivano contro la proteina basica della mielina. E' stato visto che alcune delle proteine dell'Epstein-Barr(virus che portano alla mononucleosi) possono avere anticorpi cross-reattivi, lo stesso accade nella patologia della sclerosi multipla nel ratto e anche nella malattia di Crohn in cui sono stati viste alcune similitudini tra di proteine dei micobatteri e proteine del morbo.

Le malattie autoimmuni si manifestano in diversi modi e con diversi meccanismi patogenitici, si possono formare:

- Anticorpi verso recettori: l'anticorpo riconosce dei recettori come accade nel morbo di Graves-Basedow(nella tiroide) e nella *miastenia gravis* diretta contro l'acetilcolina. Sono anticorpi bloccanti o co-stimolanti;
- Anticorpi contro antigeni di superficie o della matrice, come accade nella febbre reumatica acuta;
- Malattie da immunocomplessi, come il lupus erimatoso sistemico;
- Attivazione di linfociti citotossici, come l'artrite reumatoide e il diabete insulino-dipendente.

Tutti i meccanismi(immunocomplessi, anticorpi citotossici, linfociti T) che sono descritti come reazioni di ipersensibilità in realtà sono manifestazioni di molte malattie, incluse le malattie autoimmuni.

Il Morbo di Graves-Basedow e la Miastenia Gravis

Nel morbo di Graves-Basedow abbiamo degli auto-anticorpi(anticorpi self) che riconoscono il recettore dell'ormone tiroe-stimolante(THS), l'ormone ipotalamico che stimola le cellule epiteliali della tiroide a produrre ormoni tiroidei.

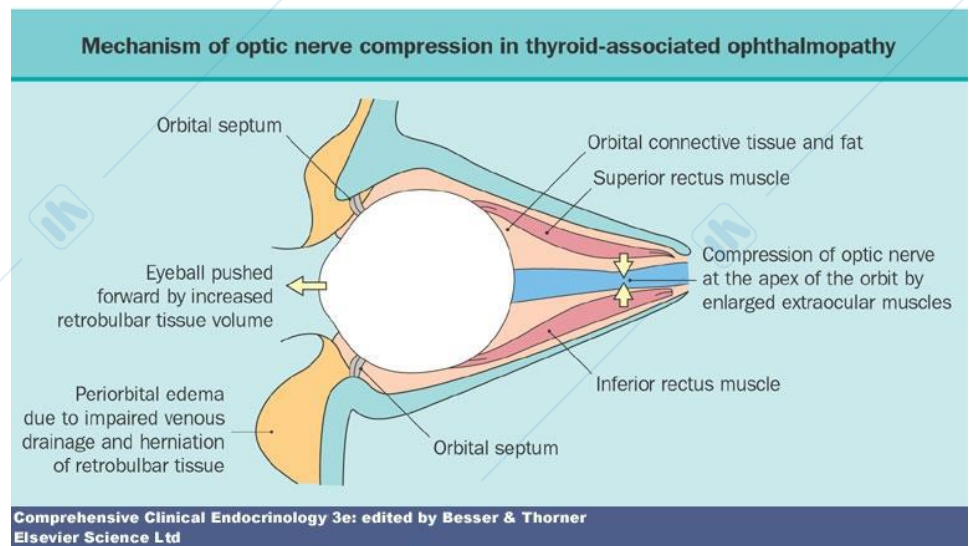
Questo autoanticorpo quando si forma riconosce il recettore TSH e lo blocca, però funziona da anticorpo che cross-legando più recettori alla fine stimola in maniera abnorme le cellule tiroidee. Una volta ingaggiato il recettore diventa un anticorpo stimolante, ovvero un anticorpo che aumenta la sintesi di ormoni tiroidei senza il legante. Una delle conseguenze è l'iperproduzione di ormoni tiroidei fuori dal controllo di TSH, tutto ciò porta all'ipertiroidismo.

E' una patologia più frequente nella donna che nell'uomo(10 volte più frequente), può portare alla formazione del gozzo(non necessariamente) e agisce intorno ai 60 anni. Si associa spesso all'esoftalmo, ovvero gli occhi sporgenti perché nelle stesse persone si formano autoanticorpi

che interagiscono con i tessuti retro-bulbari, causano un'infiammazione che spinge in avanti l'edema nei bulbi oculari.

Il Morbo di Graves è stato riconosciuto come ipertiroidismo che porta a tachicardia, perdita di peso, tremori, gozzo ed è associato

all'esoftalmo. La patologia è caratterizzata da anticorpi anti-recettoriali per il TSH e anticorpi anti-tireoglobulina. Il risultato netto è l'aumento degli ormoni T3 e T4 della tiroide, l'andamento è familiare e molte volte si associa a tutti i sintomi di un'iperattività degli ormoni tiroidei.



Comprehensive Clinical Endocrinology 3e: edited by Besser & Thorner
Elsevier Science Ltd

L'oftalmopatia, prima detta "Morbo di Basedow", si associa nel 70% dei casi di ipertiroidismo. E' un'infiammazione nella zona retrobulbare, anche questa dovuta ad autoanticorpi (diversi da quelli che riconoscono l'epitelio tiroideo). Questa infiammazione crea un edema e un infiltrato a livello della zona retrobulbare per cui l'edema contrae i muscoli e spinge verso l'esterno il globo oculare che porta esoftalmo.

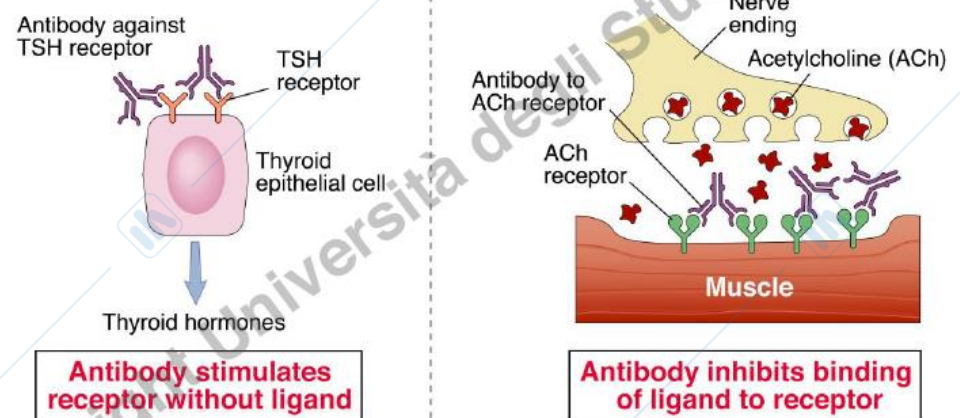
Gli anticorpi anti-recettore THS occupano il recettore come se fossero il THS, impediscono al THS di reagire però essi stessi attivano il recettore. Gli ormoni tiroidei sono prodotti a seguito dell'attività di questi anticorpi. Viene a mancare il feedback sul THS perché il recettore non viene inibito: gli anticorpi lo attivano di continuo.

Nella Miastemia Gravis (mancata contrazione della muscolatura) abbiamo degli anticorpi bloccanti che interagiscono con il recettore dell'acetilcolina rilasciata a livello delle terminazioni nervose muscolari e agisce sul recettore attivando la contrazione muscolare. Gli anticorpi legano i recettori, li bloccano, il recettore con l'anticorpo legato viene internalizzato e si perde l'espressione del recettore che dopo essere stato internalizzato, degradato e non riespresso. Non essendoci più il recettore, l'acetilcolina viene prodotta ma non può reagire per cui si blocca la trasmissione neuro-muscolare. Il paziente va incontro a paralisi: non muove più la muscolatura striata.

Nel 90% dei casi, questa patologia presenta l'espressione di anticorpi anti-recettore per l'acetilcolina. Nel 75% dei

casi, i pazienti presentano delle anomalie timiche: molte volte un timoma che è un tumore benigno del timo. Anche in questo caso abbiamo un rapporto 2:3 donna-uomo. Nella donna ci può essere anche un esordio precoce di questa malattia, si manifesta intorno ai 20-30 anni. La sintomatologia è caratterizzata da ipostemia. Inizia con una sensazione di affaticamento,

© Abnormal physiologic responses without cell/tissue injury



mancata contrazione, debolezza muscolare. Può avere inizio con la perdita della mimica facciale, ma si può anche arrivare a perdere la fonazione (voce) e all'incapacità di deglutire.

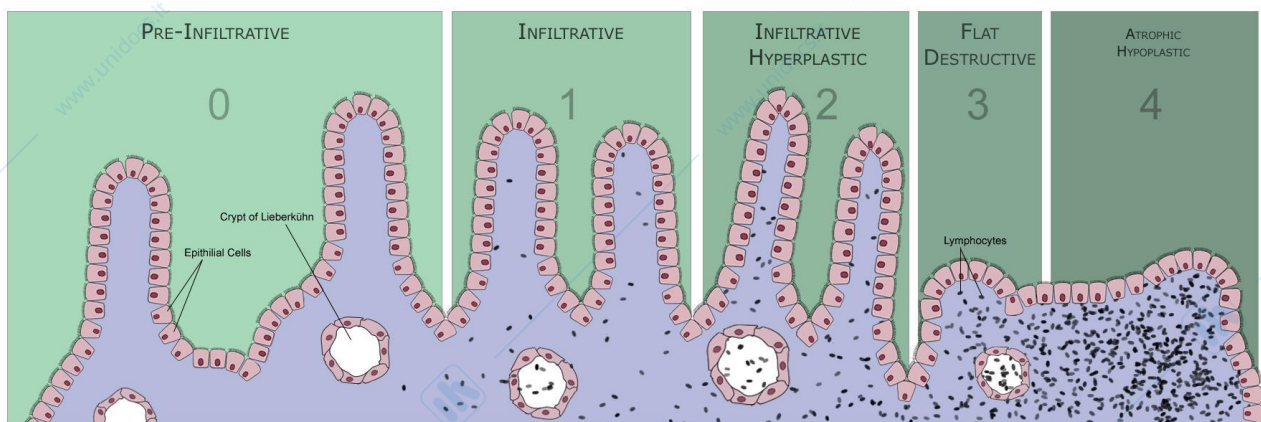
È una malattia progressiva perché se l'anticorpo reagisce con il recettore dell'acetilcolina, la internalizza e il recettore non si esprime più quella terminazione nervosa non trasmette più.

Altri anticorpi contro gli antigeni di superficie li troviamo nell'anemia emolitica neonatale. In questo caso abbiamo anticorpi che si formano contro un antigene estraneo per la madre, ma possiamo avere forme di anemia emolitica dovute alla formazione di auto-anticorpi nell'organismo.

Possiamo avere anche delle piastrinopatie di tipo autoimmune, ovvero autoanticorpi che riconoscono le piastrine.

Celiachia

È una malattia autoimmune molto frequente che riconosce il glutine come un antigene estraneo. C'è un'associazione genetica molto stretta tra DQ2 e/o DQ8 che è un apotipo necessario perché si manifesti la malattia ma non è sufficiente.



È un disordine autoimmune che sappiamo controllare perché sappiamo che lo stimolo ambientale che lo induce è il glutine, l'autoantigene tissutale è la transglutaminasi e sappiamo che l'eliminazione dello stimolo ambientale risolve la malattia (si elimina glutine dalla dieta).

Abbiamo una predisposizione genetica definita DQ2/DQ8 e lo stimolo ambientale: il glutine.

A livello genetico, sono fortemente coinvolti HLA-DQ di classe II che possono presentare adeguatamente le proteine del glutine, in particolare la gliadina. Ci sono altre componenti genetiche che non conosciamo, però se non abbiamo DQ2 e DQ8 non abbiamo celiachia.

La malattia si sviluppa perché abbiamo un riconoscimento a livello del lume intestinale della gliadina viene digerita, processata e il peptide (α -gliadina) viene riconosciuto dall'HLA-DQ. HLA-DQ è stata anche cristallizzata: sappiamo quali sono gli AA che legano la gliadina.

Il problema è che questo autoantigene è molto simile alla transglutaminasi tissutale (c'è mimetismo genetico), che lega lo stesso HLA, e l'endomisi. Gli anticorpi che si formano contro la gliadina: prima c'è la stimolazione dei linfociti T helper, poi la produzione di anticorpi contro la gliadina che interferiscono e riconoscono molecole self, ovvero l'endomisi e la transglutaminasi, scatenando la risposta. I linfociti T che agiscono a livello della parete epiteliale dei villi intestinali e man mano che la malattia progredisce possono danneggiare i villi portando a mal assorbimento.

I sintomi della celiachia sono solitamente gastrointestinali: diarrea da malassorbimento e feci acquose che possono portare a disidratazione, deplezioni eterolitiche ed acidosi metabolica. Abbiamo inoltre malassorbimento di grassi che nel colon vengono trasformati dai batteri in sostanze irritanti ed osmotiche producendo anche flatulenze. Può esserci anche una perdita di peso che nei bambini porta ad un ritardo di crescita. Facile stancabilità (astenia), debolezza muscolare e dolori addominali (crampi) sono altri sintomi associati.

Solo i pazienti che manifestano le lesioni mucosali hanno una celiachia sintomatica, la malattia è per la maggior parte dei casi silente e può essere latente se la mucosa normale esprime una reazione improvvisa.

La diagnosi si fa cercando gli anticorpi IgA (Non bastano le IgG) delle mucose contro le transglutaminasi, l'endomio e gli antigliadina. La certezza deriva dalla gastroscopia che ci dice se l'intestino ha delle lesioni specialmente a livello del tenue. Gli anticorpi possono essere controllati, ma l'unico trattamento è una dieta ferrea a vita. Il vero problema è che i disturbi sintomatici sono molto svariati e si confondono con le intolleranze alimentari, ciò rende la diagnosi difficile.

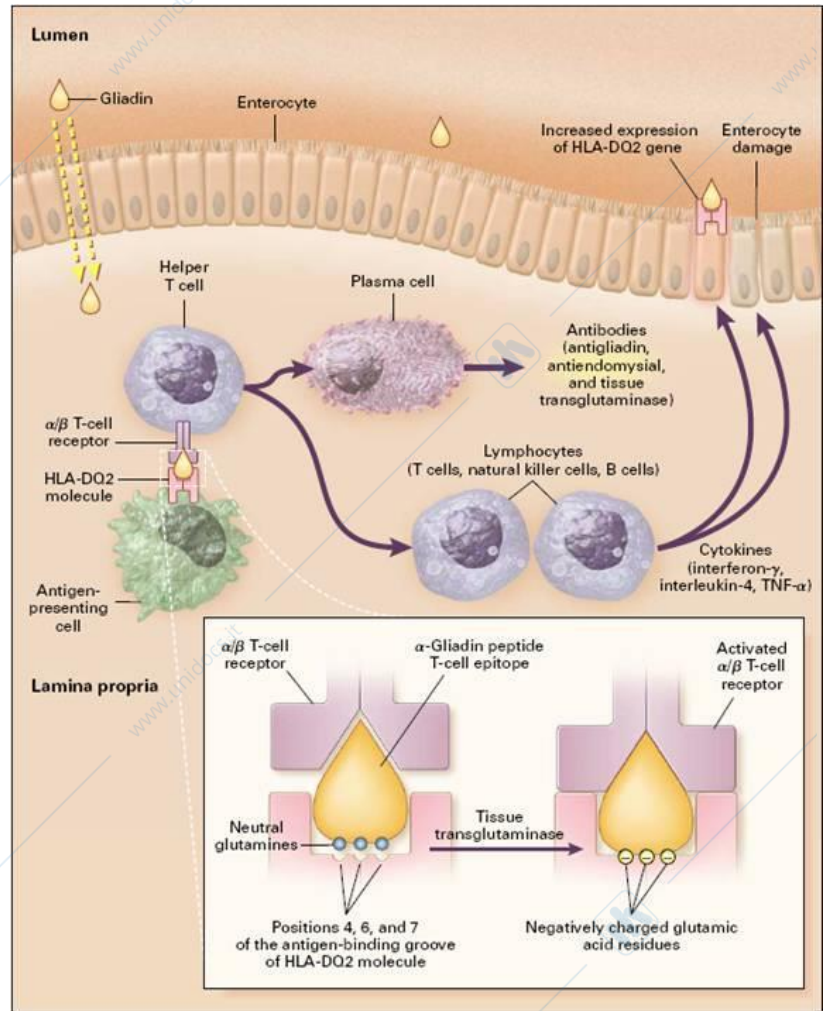
Il lupus eritematoso sistemico (LES)

È una malattia da immunocomplessi su base autoimmune, si formano in maniera massiccia diversi anticorpi (anti-nucleo, anti-DNA a doppia elica, anti-istoni). Questi danno manifestazioni tipiche degli immunocomplessi:

- ✓ Vasculiti, per deposito di immunocomplessi a livello vascolare;
- ✓ Eritemi, come manifestazione cutanea. Ci possono essere anche aree di calvizie. L'eritema è caratteristico perché colpisce a livello del volto formando una "farfalla". Può colpire anche spalle e mani;
- ✓ Glomerulo-nefriti;
- ✓ Artriti, tra cui l'artrosi a livello delle mani (spesso associata a dermatite);
- ✓ Disturbi a livello neurologico e psichiatrico;

Al 90% si manifesta nelle donne nell'età adulta, l'incidenza è 1-8 su 100 mila persone. La diagnosi non è facile perché gli auto-anticorpi che si formano sono presenti anche in altre patologie su base autoimmune, come le malattie reumatiche del connettivo e delle articolazioni. Ci sono 4 criteri cumulativi tra gli 11 proposti dall'associazione internazionale. Sintomi sono:

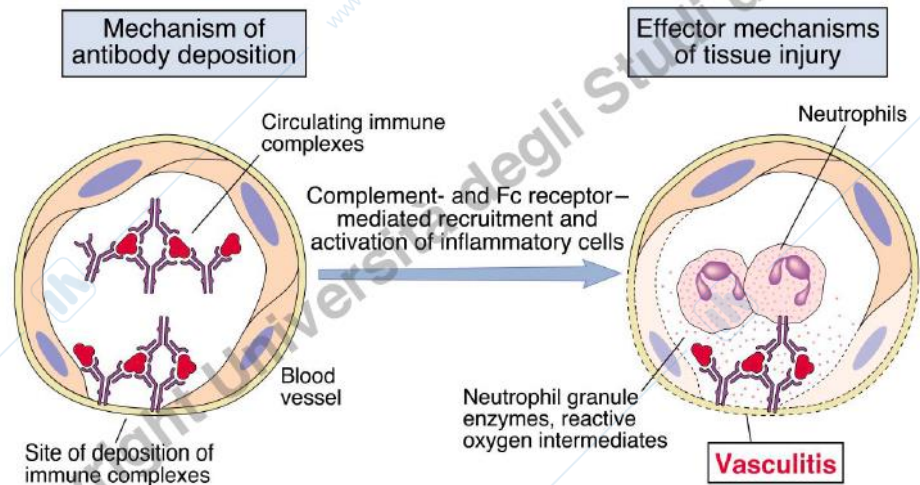
- ❖ Rash malare (eritema "a farfalla");
- ❖ Rash discoide, lesioni tondeggianti sulla cute;
- ❖ Presenza di fotosensibilità, ovvero reazione alla luce che causa l'arrossamento della pelle;
- ❖ Presenza di ulcere orali, lacerazione della mucosa orale;
- ❖ Artrite di due o più articolazioni;
- ❖ Sierosite, ovvero l'infiammazione delle sierose;
- ❖ Malattia renale;
- ❖ Malattia neurologica che comporta convulsioni;
- ❖ Malattia ematologica con annessa anemia emolitica;
- ❖ Disturbi immunologici con anti-anticorpi, come gli ANA (=anti-nuclear antibodies) present in parecchie malattie.



Gli autoanticorpi nel Lupus Eritematoso Sistemico si legano agli antigeni di superficie come ad esempio ai globuli rossi, dando anemia emolitica; alle piastrine, dando trombocitopenia (ovvero carenza di piastrine) o ai neutrofili e linfociti, dando leucopenia. Si formano immunocomplessi con nefriti, vasculiti e artrite lupica.

La cura di questa patologia si basa su farmaci anti-infiammatori o immunosoppressivi, come per tutte le patologie autoimmuni, per ridurre la sintomatologia. Le terapie possono essere continue o cicliche perché possiamo avere un'alternanza di fasi quiescenti e fasi di riattivazione della risposta. In alcuni casi si può pensare a dei trapianti di cellule staminali.

A Immune complex-mediated tissue injury

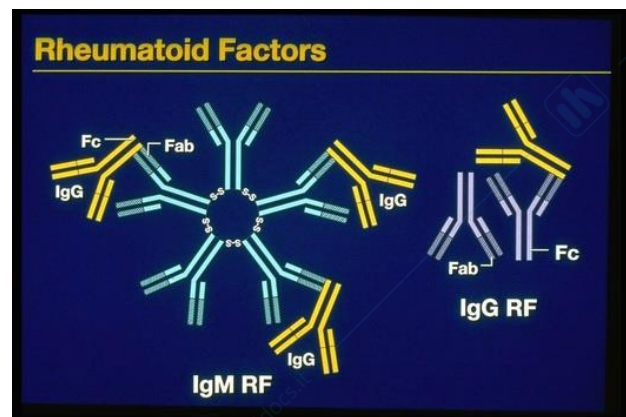


L'artrite reumatoide

In questa patologia intervengono prevalentemente i linfociti T auto-citotossici. Si manifesta come una sinovite (infiammazione della sinovia) proliferativa che forma una serie di cellule infiltrate chiamate pannus, a livello delle articolazioni. Inizia con un'infiammazione di una singola zona, solitamente a livello delle mani (dito mignolo) e poi prosegue nelle altre articolazioni. È presente nell'1,5% della popolazione con predisposizione maggiore nel sesso femminile, 5:1 maschi-femmine. C'è una predisposizione ereditaria associata a HLA-DR4 o HLA-DR1.

Abbiamo dei linfociti T helper che si attivano e la produzione di auto-anticorpi che vengono prodotti contro la regione costante (Fc) dei propri anticorpi, le IgG. Il fattore reumatoide è la presenza di immuno-complessi formati dagli anticorpi IgM che riconoscono la porzione costante delle IgG circolanti, le legano e danno delle reazioni locali.

L'artrite reumatoide si manifesta con deformità delle articolazioni progressive e si osserva che a livello dell'articolazione gli anticorpi e i linfociti T invadono la zona, si attiva una risposta infiammatoria-citotossica, viene digerita la cartilagine fino alla digestione dell'osso con attivazione degli osteoblasti. Si ha la formazione di un infiltrato di cellule infiammatorie, di solito plasmacellule, linfociti T e macrofagi che prende il nome di pannus, è un'istruttura anatomicamente solida di cellule che si forma a livello dell'articolazione e la gonfia provocando dolore. L'infiammazione porta alla distruzione della sinovia e della cartilagine, dopo un po' l'articolazione non si muove più e addirittura si può arrivare ad un riparo delle due estremità ossee (una sinfisi) grazie agli osteoblasti venuti per riparare il danno. Le cartilagini ai raggi X appaiono erose, interi pezzi di osso spariscono, l'articolazione è deformata e bloccata. La patologia colpisce soprattutto le mani che vengono dette "ad ala di uccello" perché il polso ha perso la sua mobilità. La patologia oltre ad essere invalidante, è anche molto dolorosa.



Questa malattia non è da confondere con l'artrosi che è dovuta all'invecchiamento fisiologico e non è associata ad una risposta immune in atto.

8/04/2016

VACCINI E VACCINAZIONI

Il vaccino è un

prodotto biologico o biotecnologico, prodotto per ingegneria ricombinante e costituito da microrganismi patogeni interi, uccisi o attenuati che non devono provocare la malattia. Può anche essere costituito da parti di un patogeno, come proteine associate a un patogeno che devono indurre un'immunità protettiva. Si parla di profilassi, prevenzione che eviti l'insorgere della malattia. I vaccini non costituiscono una terapia!

Dal patogeno estraiamo un gene clonato espresso da un vettore e prodotto per fermentazione. Ne è un esempio il vaccino per l'epatite B in cui l'antigene S viene usato al posto dell'intero virus. Questa proteina è sufficiente per avere un ottimo vaccino in quanto induce immunità protettiva. Oggi, la maggior parte dei vaccini sono costituiti da virus interi o attenuati perché così abbiamo tutti gli antigeni presenti, ovvero tutto il corredo antigenico. Questi tipi di vaccini sono più vantaggiosi perché non conosciamo quali proteine sono davvero immunogeniche.

La prevenzione deve essere fatta su persone sane. Le regole di sicurezza per la commercializzazione di un vaccino sono ancora più stringenti di quelle per la produzione di un farmaco. Il vaccino si basa su:

- Specificità, perché se immunizziamo una persona con un antigene prelevato da un patogeno sicuramente mi darà una risposta.
- Memoria immunologica.

Il problema del virus dell'influenza è che va incontro a diverse mutazioni, si hanno diversi ceppi. Il vaccino antiinfluenzale si basa sugli studi dei ceppi influenzali diffusi nella stagione precedente, si fa uno studio genomico e vengono preparati dei vaccini che abbiamo un miscuglio di antigeni per i ceppi che si potrebbero sviluppare per il prossimo anno.

Nel IV secolo a.C. in Cina fu introdotto il principio della "variolizzazione" inoculo per scarificazione delle narici di materiale da pustole di soggetti affetti da Vaiolo in forma lieve. Si vide che una volta superata la malattia, il soggetto sviluppava una forte resistenza. Nel 1700 questa usanza arrivò in Inghilterra, finché nel 1796 Jenner sviluppa il vaccino per proteggere dal vaiolo delle mucche. Alla fine del XIX secolo, Louis Pasteur fu il primo a studiare questo fenomeno e sviluppare il primo farmaco batterico, quello contro il colera dei polli.

Il vaccino è formato da:

- ✓ *Principio attivo*, ovvero l'antigene che deriva dal patogeno o è il patogeno intero inattivato. E' la molecola in grado di attivare la risposta immune senza causare la malattia.
- ✓ *Parte inerte* dei preparati vaccinali:
 - Liquido di sospensione, solitamente acqua distillata o soluzioni saline sterili;
 - Conservanti, come antibiotici o stabilizzanti ;

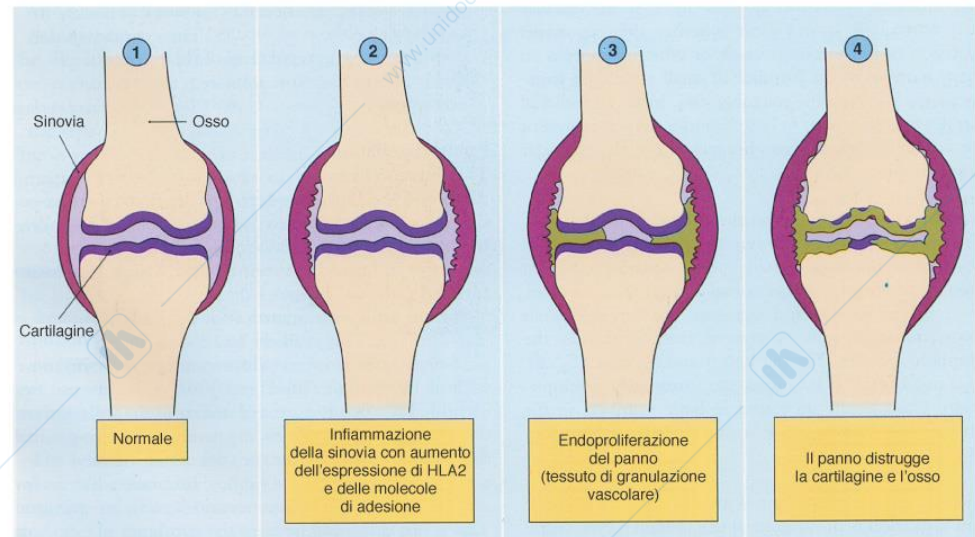


FIGURA 17-4. Sequenza delle modificazioni articolari in corso di artrite reumatoide.

- **Adiuvanti**, ovvero molecole non antigeniche che sono in grado di aumentare l'immunogenità dei vaccini. Funzionano da stimolo in quanto rendono l'attività macrofagica più precoce, più intensa e più duratura. Inoltre il vaccino diventa più riconoscibile dal sistema immune. Questi agenti ci permettono di utilizzare una minore quantità di antigene (costi minori), ridurre il numero di dosi da somministrare e modulare selettivamente la risposta immunitaria (attivare MHC di classe I piuttosto che quelli di classe II, così come scegliere se stimolare cellule T helper di tipo 1 o di tipo 2).

Requisiti fondamentali per un vaccino:

La maggior parte dei vaccini, ad eccezione di quello per la poliomielite che è orale, vanno iniettati per via intra-muscolare. Il vaccino deve essere **innocuo e sicuro**, non deve essere tossico, causare malattia o morte. Le valutazioni di tossicità vengono fatti in vitro (studi pre-clinici), su animali e poi nell'uomo (studi clinici in fase I).

Essendo il vaccino un evento di massa, è importante seguire come la popolazione risponde al vaccino, ovvero registrare quali sono i casi avversi per capire come agisce il preparato vaccinale. Il fenomeno è detto farmaco-vigilanza

Il vaccino deve essere **immunogenico**, ovvero dare una risposta citotossica umorale o cellulo-mediata valutabile in studi pre-clinici ed in prove cliniche di fase I e/o II. La risposta immune deve essere **efficace**, quindi proteggere a lungo: per questo l'ideale è fare un numero minimo di richiami che stimolino la produzione di cellule della memoria. Questo si vede nelle prove cliniche di fase III.

Inoltre un vaccino deve anche essere **pratico**: il preparato deve essere biologicamente stabile, facilmente trasportabile a diverse latitudini e temperature, avere un basso costo e una somministrazione facile senza effetti collaterali.

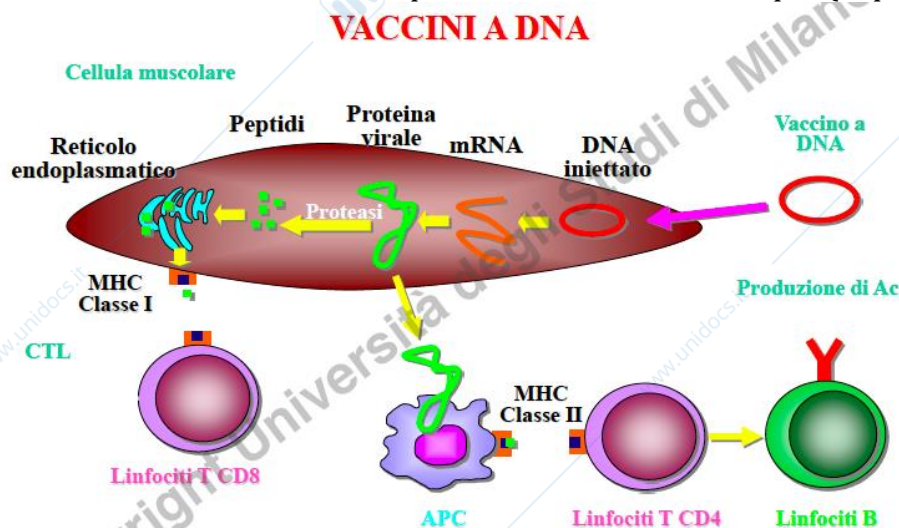
Tipologie di vaccini:

- I **vaccini interi uccisi** sono formati da virus uccisi da agenti fisici o chimici, solitamente formaldeide. Tra questi troviamo l'influenza, l'anti-polio Salk (IPV), l'epatite A, la rabbia e la pertosse.
- I **vaccini vivi attenuati** sono BCG (anti-TBC, obbligatorio per chi è militare e chi lavora in ospedale), MPR (morbillo, parotite e rosolia), anti-polio Sabin (vaccino orale, non più usato perché c'è il rischio che si abbiano revertanti = comparsa di un mutante non più attenuato e patogeno), febbre gialla e varicella. Questo vaccino è più immunogenico del primo ma può dare problemi revertanti. L'attenuazione avviene per passaggi successivi in animali adatti o in terreni di coltura particolari. Spesso si creano vaccini da varianti dello stesso virus su altre specie animali. Questi primi due vaccini hanno portato all'eradicazione della poliomielite. **RISCHI**: se il vaccino è poco attenuato, può mantenere patogenicità ma se lo è troppo potrebbe non stimolare più la risposta immune.
- Nei **vaccini con componenti purificati** la tossina è quella che provoca i danni. Il vaccino di questo tipo è costituito dalla tossina (difterica o tetanica) disattivata con formolo a 38-40°C per un mese. Vengono inoculati in una sospensione di sali di alluminio che ne aumenta l'immunogenicità oppure vengono somministrati allo stato fluido.
- I **vaccini coniugati** contengono proteine carrier perché il polisaccaride (antigene) non è una proteina, quindi pur inducendo una risposta anticorpale, non stimola adeguatamente i linfociti T. Per ottenere una risposta immune importante deve essere coniugata con proteine che vengano riconosciute estranee: gli apteni. Coniugare i vaccini aumenta immunogenicità e abbassa i costi. Il vaccino contro il meningococco ne è un esempio.
- I **vaccini ricombinanti** sono di nuova produzione, l'unico prodotto è l'antigene S contro l'epatite B (HBsAg). Questo vaccino è ottenuto clonando il gene dell'antigene S, inserito nel

lievito *Saccharomyces cerevisiae* (sistema ospite di facile moltiplicazione) che lo produce in quantità e ci da una risposta.

Il vantaggio di produrre un vaccino con proteine anziché il vaccino vivo, attenuato o ucciso comporta una maggiore sicurezza per gli operatori e fa sì che non si debbano coltivare virus in quantità.

- I **vaccini a DNA** sono costituiti solo dal materiale genetico del microrganismo, come ad esempio i plasmidi. Vengono introdotti tramite un'iniezione intramuscolare o una pistola genica (sulla cute). Inducono sia una forte risposta sia umorale che cellulare verso l'antigene. Il DNA viene trascritto nel citoplasma delle cellule dell'ospite (in particolare APC).



- La **reverse vaccinology** è una nuova tecnica che ha portato ad un nuovi vaccini contro il meningococco. I tempi per ottenere i vaccini tradizionali sono di circa 10-15 anni. Rino Rappuoli ha sfruttato il fatto che oggi si conosce il genoma di molti patogeni, studiando tutte le proteine che ha il virus, si cerca di riprodurle, si analizzano al computer, si ottiene il DNA ricombinante e si vede in silice quale è il determinante antigenico che può essere immunogenico. Sappiamo come una proteina deve essere per essere immunogenica, lo studio si basa sulla bioinformatica. Questo approccio richiede un enorme lavoro di genomica e di informatica, ma è un lavoro che impiega solo 2 anni per produrre un vaccino.

Non si possono escludere effetti indesiderabili dei vaccini, sono ben tollerati e possono dare reazioni locali come dolori, tumefazione, indurimento locale o generali come febbre, malessere, irritabilità ed esantema. Le complicanze possono essere dovute all'iperattività del soggetto al vaccino stesso, dipendono sempre dall'individuo. I danni più gravi possono essere associati ai sistemi nervoso (convulsioni, encefalopatie e paralisi). Comunque gli effetti della malattia sarebbero molto più gravi, se non letali.

E' importante per la salute pubblica raggiungere un'ampia copertura vaccinale perché chi non è vaccinato diffonde il patogeno attorno a sé. Il fattore di contagiosità $R_0=4$ indica che un portatore di patogeno è capace di infettare 4 individui.

Il morbillo ad esempio ha un fattore $R_0=20$. Dobbiamo proteggere molto più del 95% della popolazione (soglia minima) per avere una protezione a livello comunitario contro il morbillo. Per il vaccino trivalente Morbillo-Parotite-Rosolia il rischio è tra il 10 e il 15 di fattore di rischio, mentre la poliomelite ha $R_0=5-6$ per questo è stata più facile da debellare.

ONCOLOGIA

In Italia, i tumori rappresentano il 30% di tutti i decessi: 35% uomini e 26% donne. È la seconda causa di decesso in Italia (prima sono le malattie cardiovascolari).

Dal 1996 al 2014 c'è stato un calo di mortalità del 18% fra gli uomini e 10% fra le donne.

C'è stato però un aumento del 61% nelle diagnosi di tumore al polmone nelle donne.

È stabile il numero di nuovi casi di tumore al polmone: 366mila nei 2013 e 365mila nel 2014.

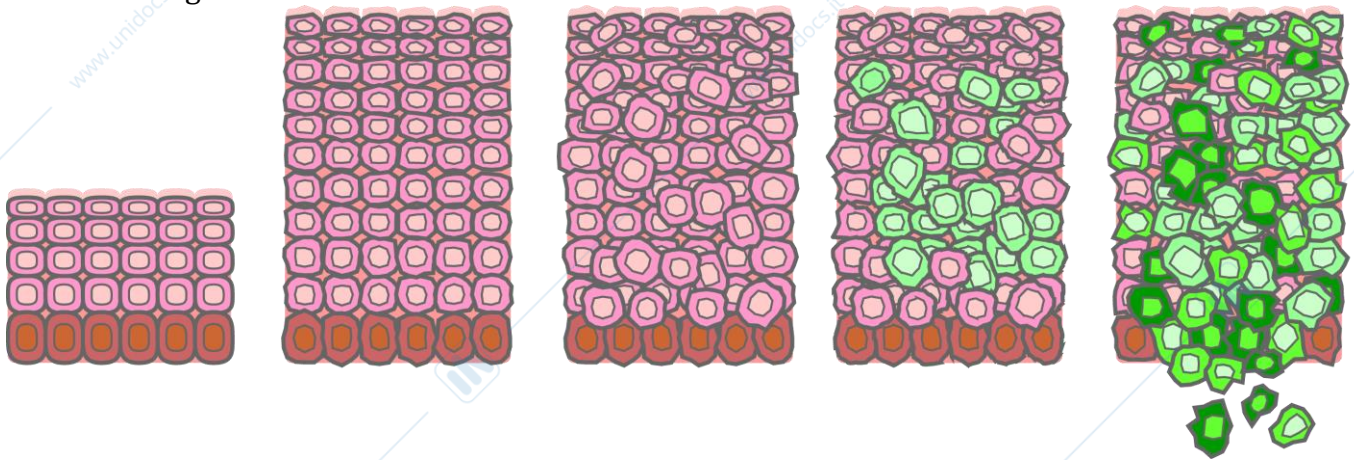
La maggior incidenza negli uomini si riscontra alla prostata, mentre per la donna nel seno.

Il cancro con mortalità maggiore è il tumore al polmone (più nell'uomo e meno nella donna), quindi prostata e seno sono maggiormente curabili. La probabilità di sviluppare il cancro, in una persona sana, nel corso della vita è 1 su 2 nell'uomo e 1 su 3 nella donna.

Per molti tumori c'è un miglioramento nella percentuale di sopravvivenza 5 anni dopo la diagnosi.

Quelli con più bassa percentuale di sopravvivenza sono il cancro al colon e quello al polmone; mentre il tumore alla prostata è uno di quelli con più probabilità di sopravvivenza.

Il numero di morti per cancro evitate grazie a diagnosi precoce e cure dal 1991 al 2011 sono 1'071'600 negli uomini e 447'700 nelle donne.



Tumore, neoplasia, cancro sono sinonimi per indicare una crescita abnorme e autonoma di cellule di un determinato tessuto. Possiamo distinguere tumori in:

- **Tumori benigni:** tessuto che va incontro ad una proliferazione eccessiva, ma si tratta di cellule che mantengono forma e funzione del tessuto da cui si originano. È un'iperplasia esagerata. Passiamo poi ad avere displasia, nel caso in cui le cellule differiscono per alcune caratteristiche dal tessuto normale. Questa viene considerata una lesione pre-neoplastica. Da displasia si passa a carcinoma in situ: abbiamo le prime cellule tumorali che si sviluppano nel tessuto di origine che sono considerate displasie severe e potrebbero anche regredire, anche se nella maggior parte dei casi portano a tumori maligni.
- **Tumori maligni**

Nel caso una cellula subisca danno al DNA, questo danno viene mantenuto nella cellula figlia e, anzi, rende il DNA ancora più instabile e più portato a mutazioni.

Nomenclatura

Tumori benigni: nome del tessuto d'origine, con suffisso -OMA.

Tumori maligni: nome del tessuto d'origine + CARCINOMA (origine epiteliale)/ SARCOMA (origine mesenchimale)/ ADENOCARCINOMA (origine ghiandolare).

La leucemia è una trasformazione neoplastica che interessa cellule mieloidi e linfoidi. Classifica una serie di tumori circolanti (non solidi) perché riguardano cellule nel sangue, che difficilmente formano massa solida. Il linfoma, invece, è una trasformazione neoplastica che riguarda linfociti T maturi. È un tumore solido.

Tumore benigno

- Caratterizzato da una crescita lenta;
- Abbiamo un'attività mitotica bassa: la percentuale di cellule in replica è abbastanza bassa;
- Le cellule sono ben differenziate: mantengono quasi del tutto la struttura della cellula originale;
- Generalmente sono capsulati con connettivo, quindi solitamente sono facilmente enucleabili;
- Non sono invasivi;
- Non sono metastatizzanti, ovvero non sono causa di tumore a distanza;
- Raramente sono fatali;
- La patogenesi è caratterizzata da un effetto massa, dolore da compressione e squilibri ormonali.

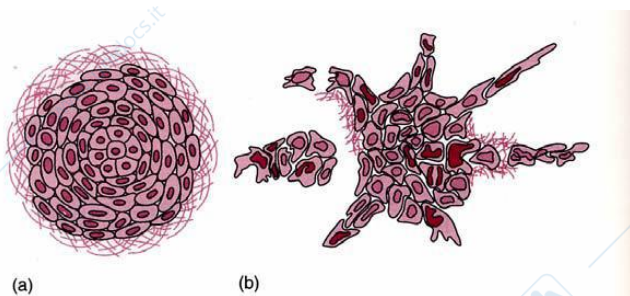
Esempi di tumore benigno: In generale, il tumore benigno cresce verso l'esterno (a volte presenta anche un asse di simmetria), mentre quelli maligni crescono all'interno.

Papilloma a peduncolo (o polipo): tipico è quello del colon. C'è una disfunzione genetica, che porta a formazione di polipi; il rischio di andare incontro a cancro al colon è maggiore nei soggetti con questo papilloma. È un tumore sporgente verso l'esterno, ciondola da una superficie attaccato ad uno stelo.

Papilloma cutaneo → verruca. Escrescenza su una superficie epiteliale che presenta lunghe e sottili digitazioni-papille. Ha una superficie maggiore a parità di volume, si replica in modo più attivo e abbiamo progressione più frequente.

Tumori maligni

- E' caratterizzata da crescita rapida;
- C'è un'elevata attività mitotica;
- Cellule poco o per nulla differenziate: le cellule perdono completamente la capacità di differenziarsi, come i tessuti normali.
- Abbiamo anomalie morfologiche;
- C'è un diverso rapporto nucleo-citoplasma: il citoplasma è quasi tutto occupato dal nucleo;
- Sono invasivi, ovvero crescono per contiguità nei tessuti adiacenti;
- Se crescono in organi dotati di capsula, i tumori invadono la capsula e i tessuti vicini;
- Sono metastatizzanti;
- Spesso sono fatali.



Caratteristiche	Benigno	Maligno
Morfologia cellulare	Normale	Anormale
Morfologia tissutale	Ordinata	Disordinata, irregolare
Velocità di crescita	Più del normale	Rapida
Invasività	Non comune	Tipica
Metastatizzazione	Mai	Tipica
Capsula	Tipica	Rara o incompleta
Prognosi	Buona	infausta

PAP test: esame diagnostico utile ad individuare cancro alla cervice uterina. Si vedono grossi nuclei scuri che occupano la maggior parte della cellula, il citoplasma è scarso. Inoltre, si vedono frammenti di globuli bianchi.

La cancerogenesi è processo di formazione di un tumore: è di tipo progressivo, a tappe successive che comportano cambiamenti fenotipici ma anche genici. La maggior parte dei tumori è di origine monoclonale in quanto la cellula che va incontro a mutazioni genetiche è una sola. Questo evento la rende indipendente nella crescita. Man mano che la cellula cresce, le cellule si differenziano (perché sono instabili) e danno origine a varianti della cellula tumorale. Le cellule di un tumore non sono geneticamente e fenotipicamente omogenee.

Ulteriori mutazioni producono differenze nel comportamento cellulare quali:

- Capacità invasiva;
- Capacità metastatizzante;
- Resistenza alla terapia.

Comportamento delle cellule tumorali maligne in coltura:

- Minore necessità di fattori di crescita (rispetto a cellule normali);
- Perdita di coesione reciproca;
- Possibilità di crescere in sospensione;
- Perdita dell'inibizione da contatto;
- Immortalità;
- Metabolismo anaerobico;
- Tumorigenicità in vivo.

La capacità invasiva è la crescita per contiguità delle cellule tumorali maligne nei tessuti circostanti (matrice extracellulare, tessuto vascolare, tessuto nervoso). Inoltre, le cellule tumorali maligne presentano aumentata motilità, ridotto coesione tra loro e produzione di enzimi proteolitici.

Componenti caratteristiche dell'invasione tissutale sono:

- ✓ Degradazione matrice extracellulare: grazie a metallo proteasi Zn^{2+} e Ca^{2+} -dipendenti e MMP9-MMP2 che degradano collagene di tipo IV;
- ✓ Adesione cellulare: grazie a caderine (adesione cellula-cellula) e integrine (adesione cellula-matrice);
- ✓ Motilità: grazie a chemochine e citochine chemiotattiche.

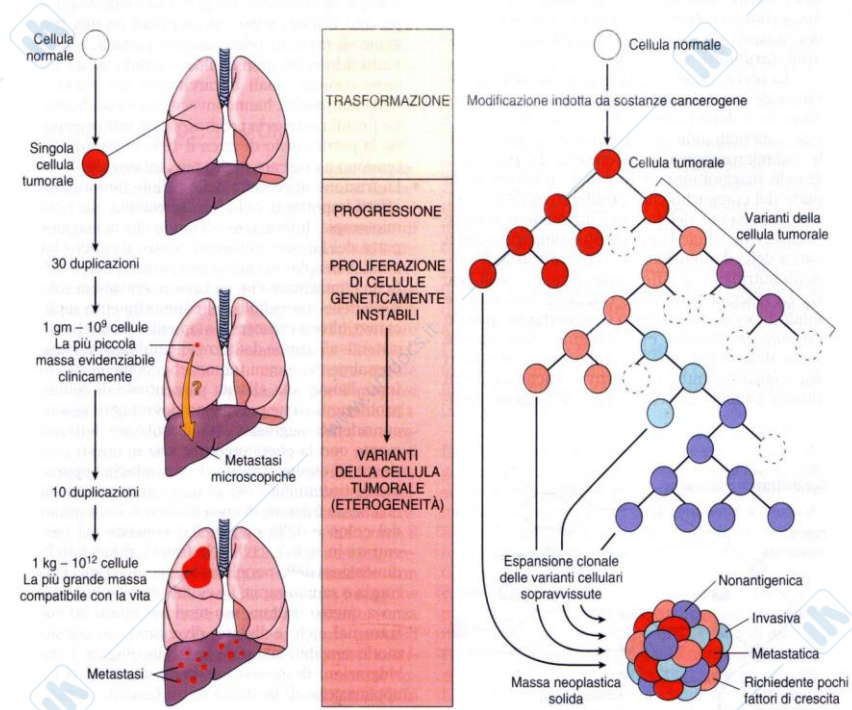
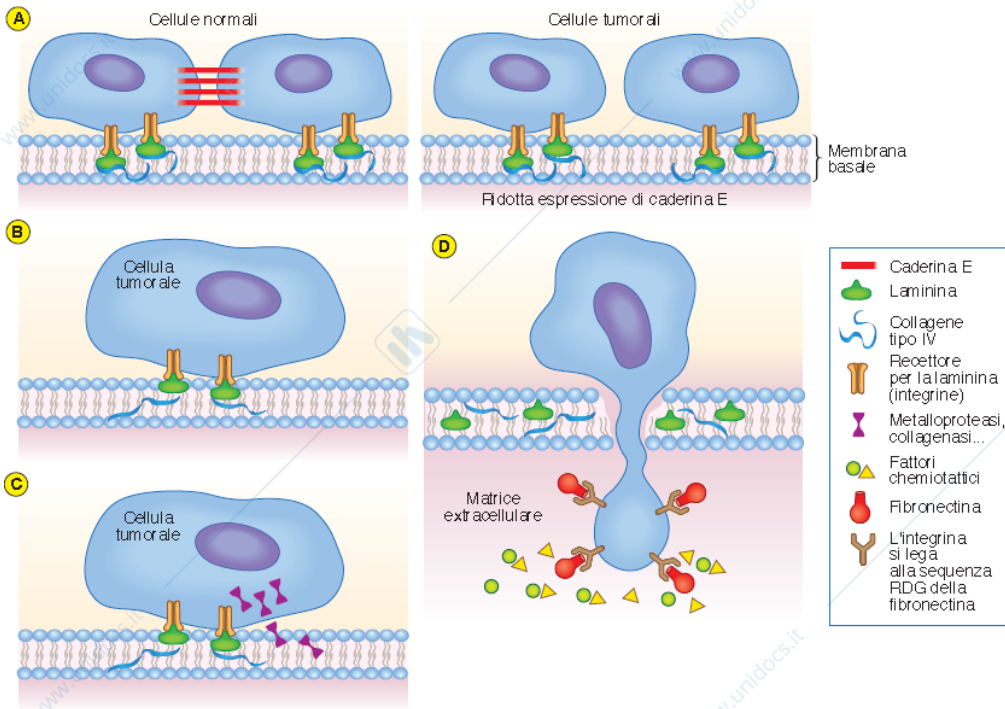


Figura 8-37. Biologia della crescita tumorale. Il riquadro di sinistra riporta il numero minimo di duplicazioni cellulari che si possono avere prima che una massa tumorale diventi rilevabile clinicamente. È evidente che quando un tumore solido viene identificato esso ha già completato la maggior parte del suo ciclo vitale valutato come numero di duplicazioni cellulari. Il riquadro di destra illustra invece l'evoluzione clonale dei tumori e l'origine dell'eterogeneità delle cellule che compongono una neoplasia. Dai discendenti della cellula originale trasformata si generano nuovi sotto-cloni e, con la progressiva crescita, la massa tumorale si arricchisce di quelle varianti che sono più adatte ad eludere le difese dell'ospite e, pertanto, probabilmente più aggressive. (Adattato da Tannock IF: Biology of tumor growth. Hosp Pract 18:81, 1983.)



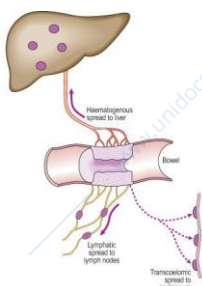
La metastatizzazione è la capacità delle cellule tumorali maligne di colonizzare organi non contigui.

È un processo multifasico:

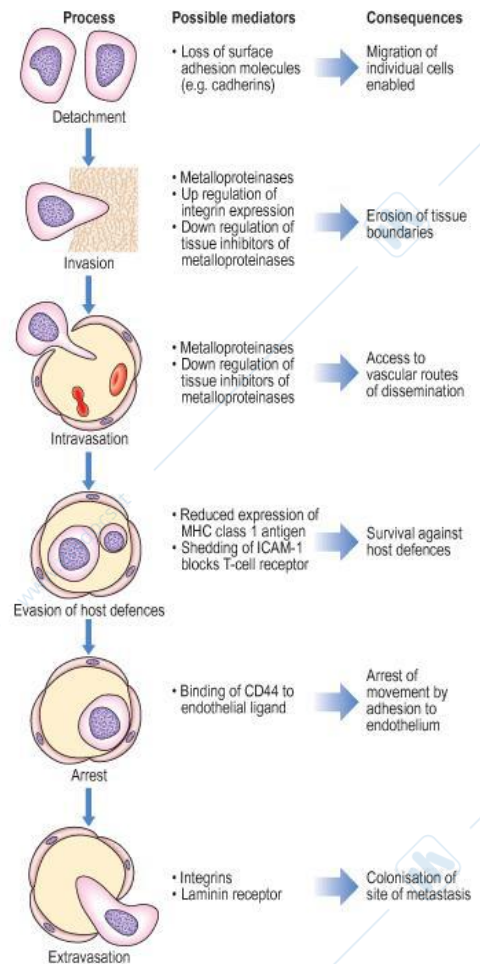
- Distacco di cellule dalla massa tumorale primaria
- Invasione di vasi ematici e linfatici
- Trasporto delle cellule tumorali come *emboli tumorali* a siti distanti
- Adesività all'endotelio del letto vascolare di organi o tessuti distanti
- Migrazione nei vasi in cui gli emboli si arrestano
- Sopravvivenza del nuovo sito → angiogenesi con extravasazione (la cellula tumorale deve essere anche in grado di indurre la propria vascolarizzazione)
- Moltiplicazione e crescita per formare tumori secondari

Esempi di vie di diffusione metastatica, ovvero di diffusione del tumore primario sono:

- ✓ Via ematica, ad esempio dal carcinoma intestinale al fegato.
- ✓ Via linfatica, dal carcinoma intestinale ai linfonodi prossimali.
- ✓ Transcelomatica, dal carcinoma intestinale al peritoneo con ascite.



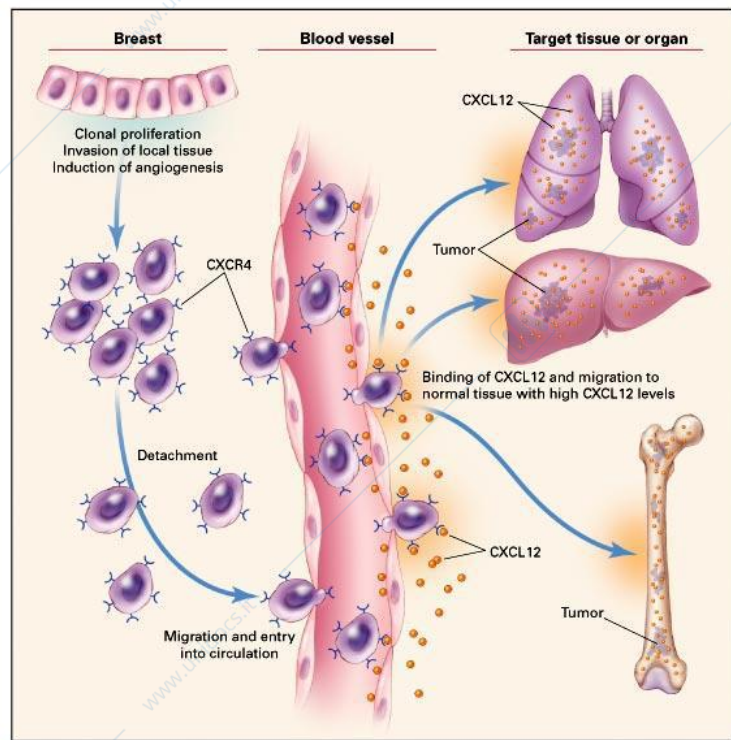
Il processo è regolato dall'espressione di recettori per le chemochine e chemochine stesse. La migrazione delle cellule tumorali e la loro metastasi sono processi molto simili alla migrazione leucocitaria. Le cellule tumorali esprimono recettori per le chemochine (importanti perché determinano sedi di metastasi). Quello più studiato è CXCR4, in



quanto viene over-espresso in molti tumori. Nel tumore mammario, i due fattori espressi sono CXCR4 e CCR7. I ligandi CXCL12 (molto espresso in midollo osseo, fegato, polmoni) e CCL21 (molto espresso nei linfonodi) esercitano un ruolo critico nel determinare le sedi di metastasi. C'è un'alta espressione di CXCL12 negli organi target delle metastasi e di CXCR4 nelle cellule tumorali.

Le cellule tumorali che esprimono CXCR4 invadono la matrice extracellulare e circolano nei vasi sanguigni e linfatici attratte da CXCL12 che è abbondantemente rilasciata dagli organi target di metastasi.

La ricerca del CXCR4 in cancro è una nuova via terapeutica che utilizza anticorpi monoclonali contro il gene o antagonisti dello stesso.

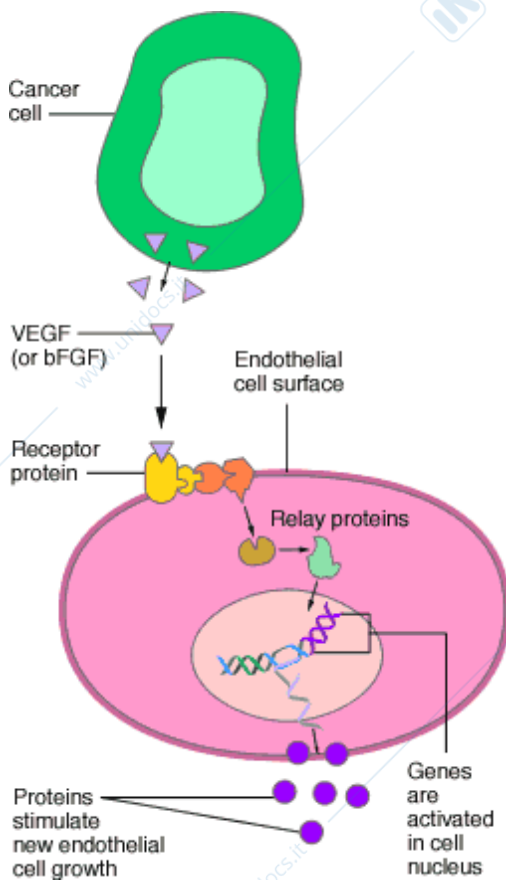


Fattori che influenzano la velocità di crescita della neoplasia sono la frazione di **cellule proliferanti**, la quantità di cellule che vanno in **apoptosi** e **l'angiogenesi**.

In assenza di apporto vascolare, la crescita del tumore è limitata dalla capacità delle sostanze nutritive di diffondere nel tumore. Le cellule tumorali cessano di crescere quando il nodulo ha raggiunto un diametro di non più di 1-2 mm.

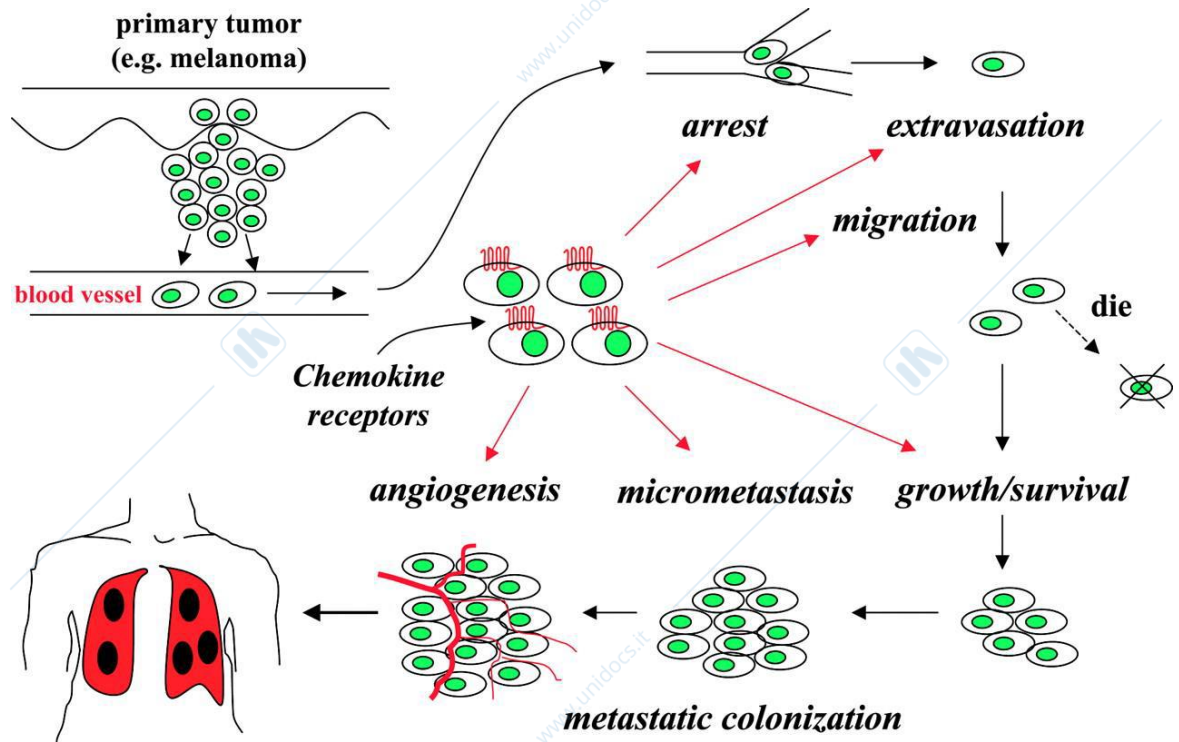
Per questo avviene l'angiogenesi nei tumori che è indotta da fattori quali il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), il fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF) ed il Fattore Trasformante di crescita α (TGF- α).

I nuovi vasi originano da venule e capillari adiacenti, non da vene arterie o arteriole.



L'angiostatina e la endostatina sono molecole capaci di inibire direttamente l'angiogenesi. L'angiostatina è una proteina 38K che deriva dal plasminogeno, mentre l'endostatina deriva dal collagene XVIII. Oggi, abbiamo degli inibitori dell'angiogenesi ad uso clinico come la talidomide, approvato per mieloma multiplo e Sarcoma di Kaposi.

Nel 2004, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) ha approvato il bevacizumab (Avastin) anticorpo contro VEGF, per terapia combinata del tumore al colon metastatico e tumore al polmone a piccole cellule.



14/04/2016

Basi molecolari degli oncogeni

Alla base di ogni tumore c'è un danno al DNA: una mutazione che normalmente tutte le nostre cellule somatiche che, in particolari circostanze, non vengono riparate danno luogo ad un tumore. Tutti i tumori presentano alterazioni genetiche, nel 94% dei casi possiamo descrivere alterazioni cromosomiche voluminose e visibili. Il 94% delle cellule porta un difetto cromosomico:

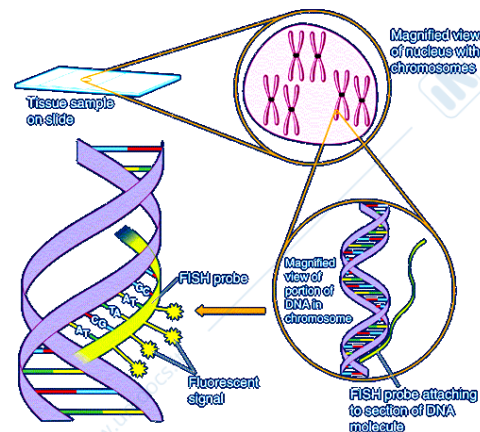
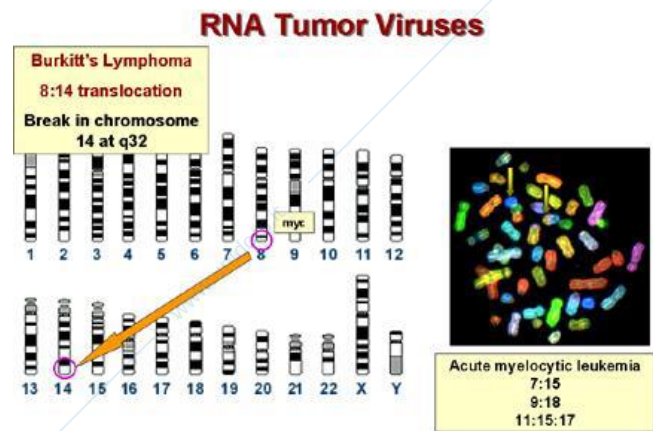
- Traslocazioni;
- Delezioni, anche una serie di basi;
- Trisomie;
- Inversioni;

Questo si è visto con il bandeggio dei cromosomi in metafase oppure con il FISH molecolare.

Il bandeggio si fa quando i cromosomi sono in metafase, la cromatina è addensata, a seconda della densità hanno colorazioni diverse. Si colora con crinacina e sali di Ag.

Se ci sono variazioni macroscopiche della cromatina, si vede bene. Ad esempio, la traslocazione t 8:14, ovvero il cromosoma 8 trasloca il 14, vuol dire che un mezzo del cromosoma 8 si è staccato ed è andato a legarsi con il cromosoma 14 nella zona q32 (q sta per porzione lunga). Questa traslocazione è caratteristica del linfoma di Burkitt.

La metodologia FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) si fa facendo ibridizzare un cromosoma con un campione di tessuto che abbia i cromosomi in metafase già addensati (*probes*). Una volta ibridizzato, il probe è legato a un segnale fluorescente, fa diventare fluorescente il cromosoma e vediamo se quella porzione si trova dove ci aspettiamo o se è traslocato. Variando il



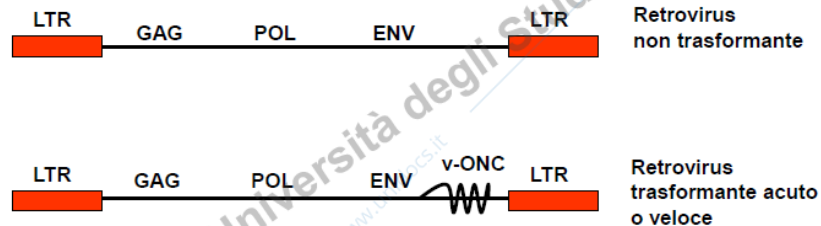
probe si fa lo studio di tutti i tumori.

I geni alterati nei tumori sono solitamente i geni che regolano il ciclo cellulare, sia quelli che lo favoriscono sia quelli che lo bloccano. Sono geni protooncogeni perché se mutati danno luogo a geni che generano tumore. All'interno possiamo suddividere i protooncogeni in:

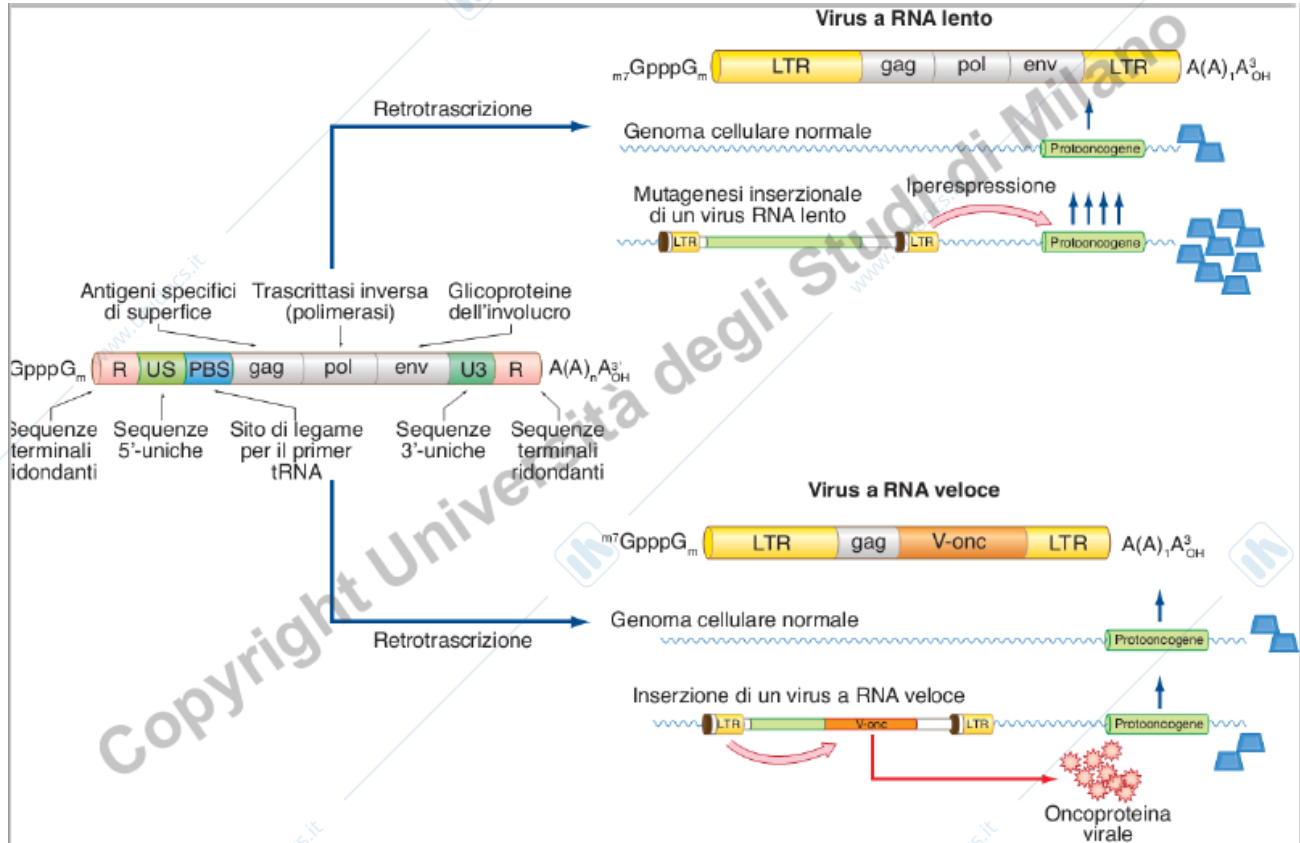
- **Oncogeni.** Sono i geni che una volta mutati hanno un guadagno di funzione, portano le cellule a produrre più recettori e più segnali di trascrizione ad esempio.
- **Geni oncosoppressori,** come p53 che normalmente ripara il DNA e blocca il ciclo cellulare. Se questo gene è mutato perde la sua funzione e quindi la cellula non va più in apoptosi.

I protooncogeni sono stati scoperti intorno agli anni '80, il premio Nobel fu conferito a Bishop e Varmus nel 1989 a seguito dello studio sui retro virus. Il retro virus per sopravvivere ha 3 geni: GAG(capside), POL e ENV. Esso infetta la cellula, trasforma il suo RNA in DNA e si integra grazie ai *long terminal repeats* (LTR).

35 anni fa furono sequenziati i primi retrovirus di ovini o uccelli. Ci si accorse che hanno un gene in più v-ONC che codifica la proteina capace di indurre tumore (proteine trasformanti virali).



v-ONC è un oncogene virale presenti nel genoma di virus trasformanti acuti. Parecchi dei virus che sono stati studiati in quegli anni sugli animali hanno in comune questo oncogene v-ONC con diversi acronimi che riflettono il tipo di tumore che questi virus possono indurre. Gli stessi acronimi si trovano nelle cellule sane perché si pensò che il virus induce tumore introducendo una porzione esogena di genoma nella cellula sana. Nacque l'idea che c'era una variazione di DNA.



Ciò fu dimostrato prendendo il DNA delle cellule normali e confrontandolo con quello delle cellule tumorali, hanno trasfettato questo gene nei fibroblasti NIH 3T3 che cresce molto e sono andati a cercare i foci di crescita (non c'è inibizione da contatto). Trovarono la proteina trasformante identificando che anche nel genoma delle cellule umane esistono degli oncogeni

trasformati. Dal tumore stesso, anziché prendere tutto il DNA genomico estrattero solo l'RNA messaggero perché identifica tutti i geni che trascrivono la proteina. L'mRNA venne copiato con la polimerasi virale, così si passò a DNA a singola elica, e trasfettando si vide che il genotipo di queste cellule è mutato. In questa maniera sono stati identificati degli oncogeni umani e sono stati trovati molto simili agli oncogeni già identificati negli oncovirus. Hanno infatti mantenuto il nome, sono stati identificati sia gli oncogeni che le proteine. Sono proteine simili alle proteine cellulari normali, ma sregolate nella loro struttura o nella loro funzione. I nomi dati a queste proteine sono gli stessi acronimi già identificati nei retrovirus. Alcune proteine oncogene sono:

- *sis*: fattore di crescita;
- *2-erb e ret*: recettori per i fattori di crescita;
- *Src*: protein-chinasi di membrana;
- *ras*: proteine di membrana che legano GTP;
- *raf*: proteine citoplasmatiche ad attività chinastica;
- *myc*: fattori di crescita nucleari;
- *ciclina*: proteine regolatorie del ciclo cellulare;
- *bcl-2*: proteine anti-apoptotiche;

Nei tumori possiamo avere un eccesso di fattori di crescita, un eccesso di recettori, un'aumentata trasduzione del segnale o un'aumentata trascrizione. Nella displasia, la lesione pre-carcinosa ha solitamente una di queste modificazioni somatiche, è molto probabile che si sviluppi tumore perché si presentano anche le altre mutazioni.

Gli oncogeni derivano dai proto-oncogeni, ovvero geni normali che codificano per proteine implicate nei processi di crescita e differenziazione cellulare. I proto-oncogeni possono diventare oncogeni in presenza di fattori che ne alterano il comportamento o la struttura.

Attivazioni dell'oncogene

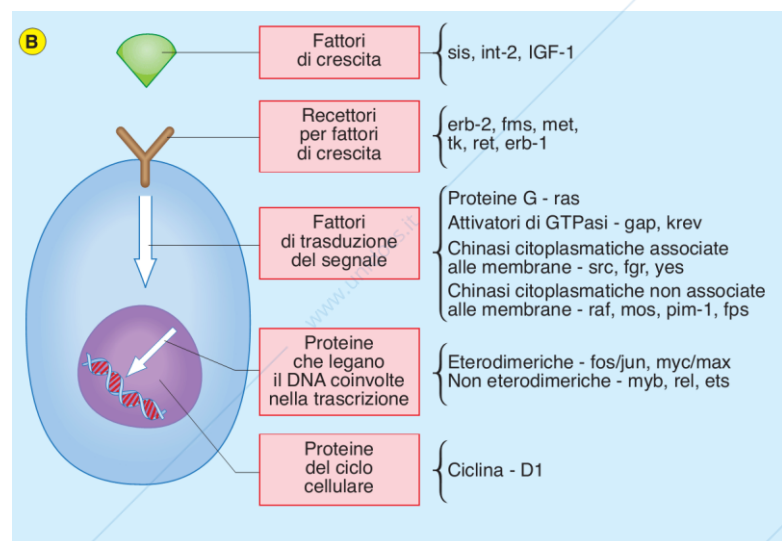
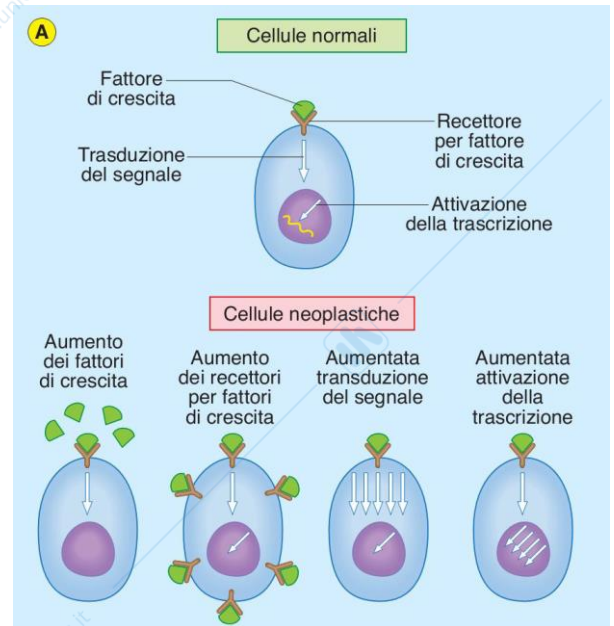
➤ Alterazioni di tipo qualitativo. Alterazioni della sequenza genica che sono:

- Mutazioni puntiformi,
- Delezioni
- Traslocazioni.

La sequenza genica è alterata, quindi lo sarà anche la proteina prodotta.

➤ Alterazioni di tipo quantitativo in cui la proteina è sempre la stessa, ma la sua produzione è aumentata per:

- Traslocazione sotto un promotore più potente



- Amplificazione genica, per cui la proteina viene trascritta in copie multiple.
- Inserzione di un virus lento in prossimità de gene, che non ha un proprio oncogene e quindi si inserisce a monte del promotore cellulare.

Attivazione per mutazioni puntiformi:

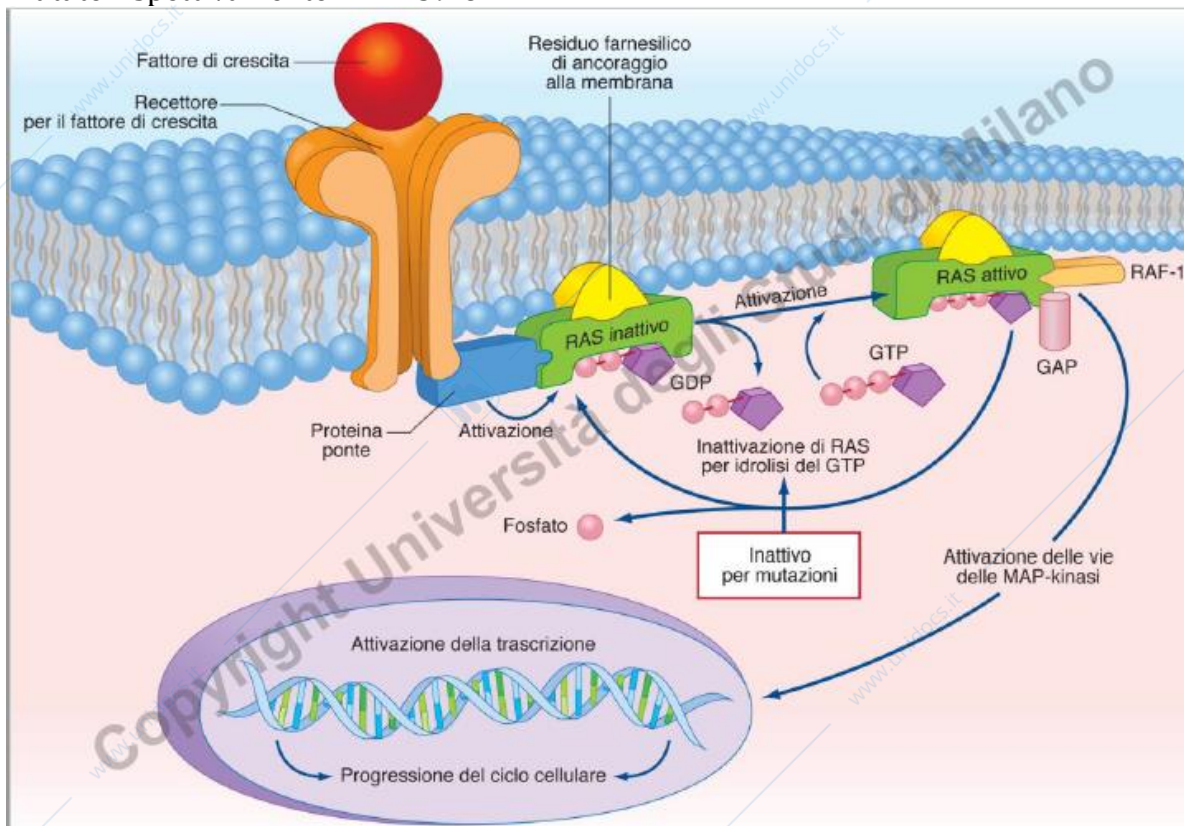
Famiglia ras, proteine G, attività GTPasica.

E' una mutazione che porta alla mutazione di proteine ras, associate a proteine G con attività ATPasica. Ne sono un esempio K-ras(A e B), H-ras e N-ras, mai identificati nei retrovirus murini ma trovati nel cromosoma umano.

Normalmente, la proteina ras si trova in membrana associata ad un recettore per un fattore di crescita(che si attiva solo quando arriva un fattore) e in condizione di riposo lega il GDP.

Quando invece viene attivato, ras si trasloca e associa ad altre proteine RAF-1 e attiva le MAP-chinasi. Ha un'attività ATPasica, idrolizza GTP a GDP, ras torna in fase inattiva e quindi il passaggio di segnale dal recettore alla cellula si blocca. La mutazione comporta la perdita della capacità di ras di idrolizzare GTP: trasferisce segnale di crescita in continuazione.

Le posizioni della sequenza di ras più mutate sono la sequenza glicina-alanina-glutamina mutate rispettivamente in 12-59-61.

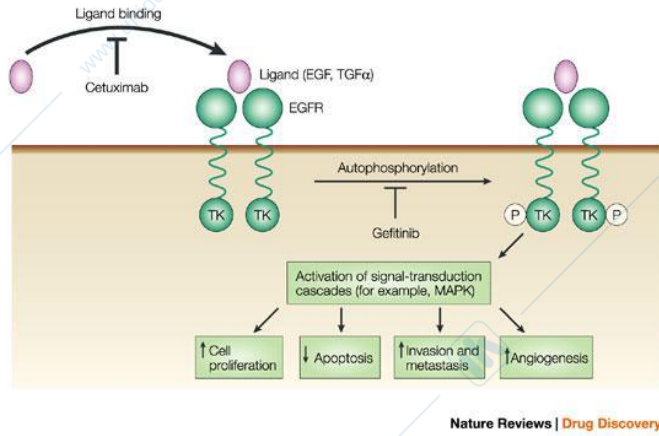


Mutazione del gene Erb-B

Questo gene è molto studiato perché è espresso nelle cellule squamose delle cellule polmonari(Erb-1), ma anche nel tumore alla mammella, al colon e alle ovaie(Erb-2). Questa mutazione puntiforme codifica un recettore simile a quello dell'EGF. Erb normale è un fattore di crescita per il tessuto epiteliale. Quando Erb-B è mutato non necessita più del legame con il fattore di crescita per fosforilare il secondo messaggero e stimolare l'attività mitogena della cellula, up-regulation e amplification.

Porta alla proliferazione cellulare, inibizione di apoptosi, invasione e metastasi con angiogenesi.

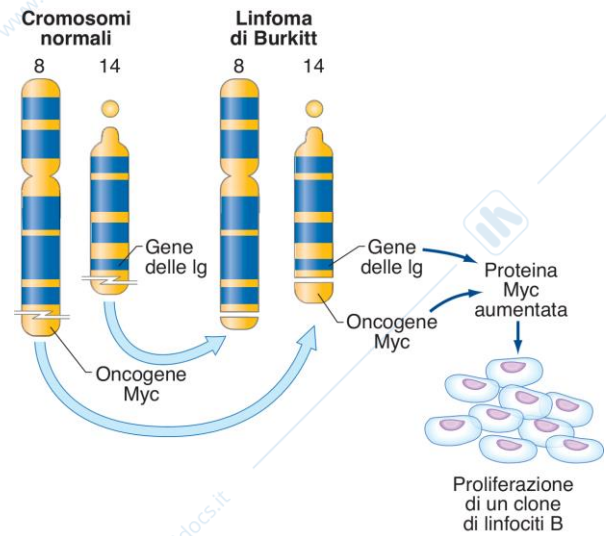
Il *Cetuximab* è un anticorpo monoclonale che impedisce di legare recettore e fattore di crescita. Inoltre è stato sintetizzato il *Gefitinib* che impedisce la trasduzione del segnale e blocca la trasduzione del segnale. Questi farmaci sono attivi solo nei tumori che esprimono la mutazione, perciò è necessario tipizzare bene il tumore. La mutazione dell'*epidermal growth factor* è over-espresso e amplificato nel 30% dei tumori al colon, le terapie finora usate inibiscono l'attività tirosin-chinasica nella porzione citoplasmatica del recettore. La terapia è personalizzata perché solo se il tumore è positivo e la mutazione di EGFR (ovvero mutazione del recettore erb) si rescive il farmaco. Il 60% dei pazienti risponde in modo positivo.



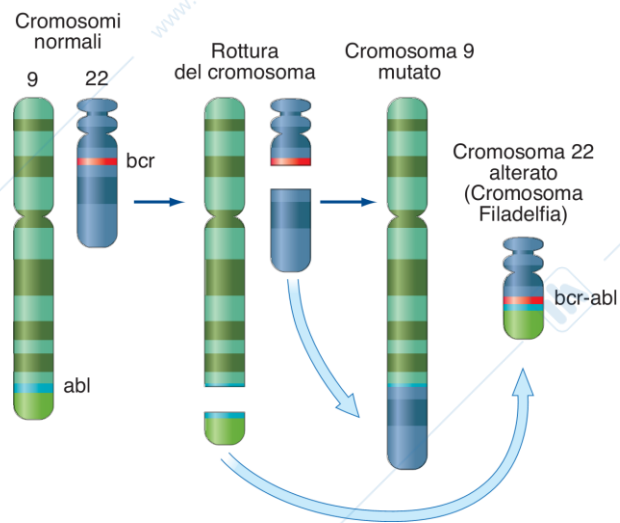
Nature Reviews | Drug Discovery

Attivazione per traslocazione

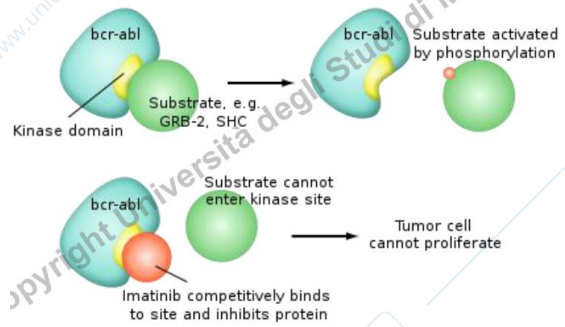
Le traslocazioni sono state individuate con la tecnica dei bandeggi, molto prima delle altre mutazioni. La traslocazione più conosciuta è la t 8:14, tipica del linfoma di Burkitt, in cui l'oncogene *myc* trasloca dal braccio lungo del cromosoma 8 al 14 e una porzione del 14 trasloca all'8. Le traslocazioni sono solitamente reciproche: *myc* nel cromosoma 14 va a legarsi nella posizione dove si trovano i geni delle catene pesanti delle immunoglobuline. I linfociti B hanno questi geni trascritti, il fatto che *myc* traslochi in questa posizione causa una proliferazione aumentata della proteina *myc* (nucleare) e quindi tutto il clone dei linfociti B aumenta la sua produzione.



Un altro esempio è la traslocazione 9:22 in cui abbiamo coinvolti ben 2 oncogeni: *abl* e *bcr* che porta alla leucemia mieloide cronica del cromosoma di Philadelphia (CML). La leucemia cronica del mieloide porta ad un disordine proliferativo delle cellule ematopoietiche staminali. Un singolo difetto molecolare basta per causare la trasformazione neoplastica. Nel braccio lungo del cromosoma 9 si trova il gene *abl*, nel braccio lungo del cromosoma *bcr*. I due frammenti si rompono, si forma un cromosoma 9 mutato molto lungo e il 22 (già più piccolo) va ad alterarsi.



Sappiamo che formandosi questa traslocazione, i due cromosomi *bcr* e *abl* si trovano insieme e danno luogo a una nuova proteina di funzione che codifica in modo completamente nuovo. Questo è un vantaggio clinico e farmacologico della protein chinasi perché la sua attività chinasi è a random, senza controllo e capace di modificare il citoscheletro, inibisce l'apoptosi, aumentai segnali chinasi, attiva *ras*, *myc* etc. Di per sé la proteina attiva la proliferazione in tanti modi. Il vantaggio è che avendola cristallizzata, si è creato un sito attivo e quindi un sito inibitore. Sono emersi dei casi di resistenza al *Glivec*(*Imatinib* come principio attivo), il farmaco sintetizzato con queste conoscenze.

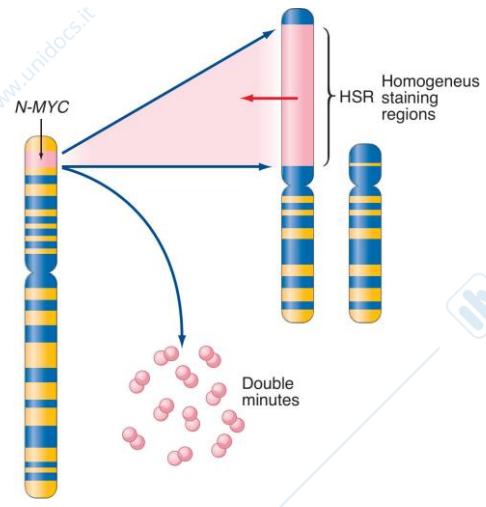


Attivazione per amplificazione genica

Il gene può essere non mutato, la sequenza dell'oncogene rimane uguale ma il gene è amplificato per diversi motivi:

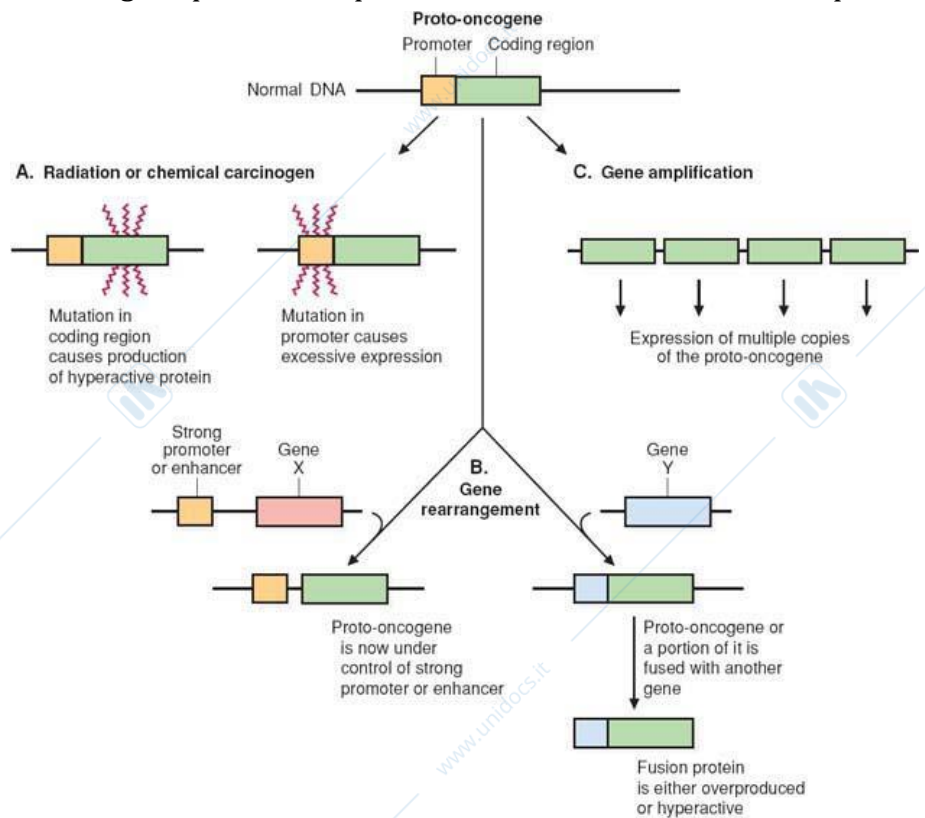
- Abbiamo delle copie multiple
- Il genoma si frammenta dando dei *double minutes*
- Vengono prodotte HSRs
- Abbiamo un promotore forte

In casi come N-MYC, l'oncogene si duplica tante volte un errore del genoma che produce le *homogeneously staining regions*(HSRs). Si trovano numerosi frammenti extracromosomiali di DNA, chiamati *double minutes*, sparsi nel nucleo e codificanti. RARa(*retinoic acid receptor-a*) è il fattore trascrizionale riconosciuto come target per gli estrogeni nelle cellule del tumore al seno in quanto è molto più presente che nelle cellule normali.



Il promotore forte può amplificare l'oncogene perché se il promotore cambia, ovvero diventa più forte quando inerisce un promotore virale. Se il promotore è forte, anche la sintesi della proteina può diventare sregolata. I virus che provocano questo effetto sono i retrovirus trasformanti lenti che non contengono *v-onc* nel loro genoma e inseriscono al 5' o al 3' della cellula ospite un protocogene casuale.

Se la Trasformazione avviene a monte, il gene viene attivato dal promotore del virus. Dato che questa inserzione è un evento casuale, può non verificarsi a tutte le proteine del virus. Avviene sempre negli animali, tranne HTL-1 e HTL-2 che causano tumori ai linfociti T, specie in nord Africa.



I *geni oncosoppressori*, detti anche anti-oncogeni, sono geni che codificano per proteine che regolano negativamente la crescita cellulare. Bloccano la proliferazione o inducono la cellula a morire se il DNA è alterato, impedendo alla cellula di moltiplicarsi in modo incontrollato. Le mutazioni in questo caso sono spesso delle delezioni che fanno perdere parte del gene o introducono un codone stop che impedisce alla proteina di essere sintetizzata. Queste proteine mutate sono solitamente bcl-2 e p53 (regolano l'apoptosi), RB1 (regola il ciclo cellulare) o BRCA1 e WT1 (fattori trascrizionali). L'attivazione dei geni oncosoppressori avviene tramite:

- Delezione genica su entrambi gli alleli (deve avvenire su entrambi per manifestarsi altrimenti c'è esclusione genica, come per i geni recessivi);
- Mutazioni inattivanti;
- Repressione permanente per ipermetilazione del DNA.

Un esempio di gene che subisce un'amplificazione genica è il gene del retinoblastoma. Questa alterazione porta ad un tumore pediatrico che può avere andamento familiare o sporadico:

- Nella forma familiare il cromosoma 13 è già mutato, occorre che ci sia una mutazione somatica per avere una mutazione su tutti e due gli alleli, abbiamo delezioni della stessa regione sui bracci lunghi del cromosoma 13.
- Nella forma sporadica invece si verificano due successive delezioni somatiche dovute all'ambiente, come i raggi X, UV etc. Questo caso è più raro, colpisce la retina dell'occhio.

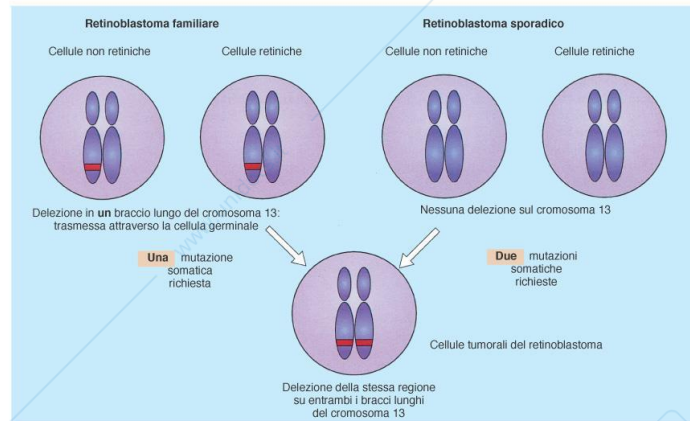
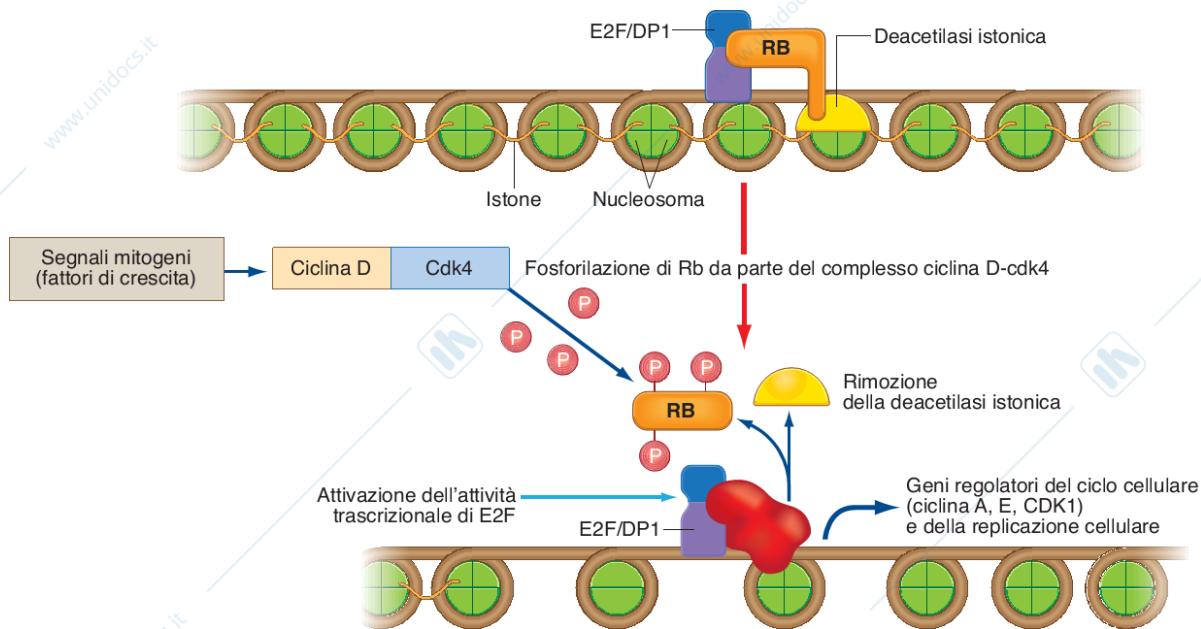


FIGURA 2-14. Nel retinoblastoma familiare sia i retinoblasti che le cellule non retiniche presentano alla nascita una mutazione di uno dei due alleli codificanti la proteina Rb. Questa alterazione viene trasmessa attraverso le cellule germinali da uno dei due genitori. Solo un ulteriore evento mutazionale a carico del secondo allele è necessario per produrre la mutazione omizigote richiesta per la formazione del tumore. Nel retinoblastoma sporadico sia i retinoblasti che le cellule non retiniche non presentano alcuna anomalia in entrambi gli alleli del gene Rb. Due eventi mutazionali, ciascuno a carico di un allele del gene Rb, sono quindi necessari perché il retinoblastoma insorga.

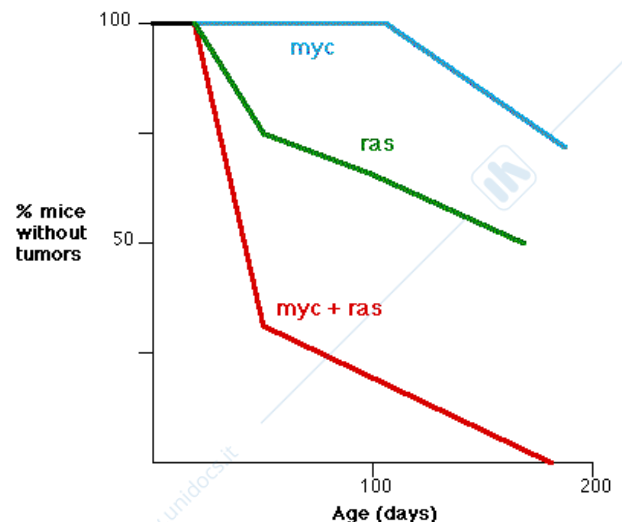
Rb è una proteina che lega il fattore trascrizionale Rf e DP1 bloccando il ciclo cellulare alla fase S. Perché la cellula inizi a sintetizzare DNA occorre che Rb non ci sia più, ovvero che venga fosforilata, si stacchi e formi E2F. Rb viene fosforilata dalla ciclina normalmente, quando questa si attacca la sintesi si blocca.

Nei pazienti con delezione di Rb, questo fattore non è presente, la delezione a tutti e due gli alleli porta a una scomparsa del gene, non c'è più sintesi di Rb a causa della delezione genica e quindi la cellula continua a proliferare.



p53 mutata è una delle più frequenti mutazioni tumorali, si trova deleta o mutata nell'85% dei tumori. La sua funzione in una cellula normale è di attivarsi in risposta ad un danno cellulare: arresta il ciclo cellulare e attiva enzimi di DNA in G1 e se non ci riesce porta la cellula in apoptosi. Le cellule con la mutazione invece proliferano con anomalità genetica, p53 è una mutazione che si somma ad altre. Se non sono mutazioni tossiche per la cellula, queste vengono trasmesse alle cellule figlie.

La percentuale di topi transgenici con oncogeni mutati aumenta con l'aumento del numero dei geni mutati: se ne inseriamo solo uno mutato, ad esempio solo *myc*, si ha lo sviluppo del tumore in 100 giorni, se invece si inserisce solo *ras* il cancro si manifesta un po' prima. Se invece i due si sommano, la massa tumorale cresce è ancora più velocemente. Si ha un effetto sinergico dei due oncogeni.



15/04/2016

Attivazione per attacco di agenti infettivi

Il 20% dei tumori sono da attribuire ad agenti infettivi. Un virus associato a tumori viene classificato come infettivo carcinogeno di classe I, ne sono un esempio:

- Il 100% dei tumori alla cervice uterina sappiamo che è causato dal *Papilloma virus*.
- Il 70% dei tumori allo stomaco dall'*Helicobacter Pylori*.
- Il carcinoma del fegato è associato al *virus dell'epatite B e C*, ma una percentuale più bassa è legata al *virus di Epstein-Barr* e una piccola percentuale agli elminti.
- Il tumore al fegato è anch'esso associato alle epatiti B e C.

Helicobacter Pylori

L'*Helicobacter Pylori* è un batterio Gram -, flagellato (si muove in coltura liquida) e microaerofilo. Infetta la mucosa gastrica, si fa una nicchia tra il muco e la cellula stessa per proteggersi dal pH acido dello stomaco. Produce un enzima chiamato ureasi che scinde l'urea in ammoniaca e CO₂. L'ammoniaca in acido diventa ammonio e alza il pH dello stomaco.

È un batterio, perciò causa infiammazione, il sistema immune lo riconosce e si attiva. Più lui produce ureasi, più causa danni epiteliali, fino alla loro modificazione. È associato all'ulcera gastrica e svilupparsi in carcinoma gastrico.

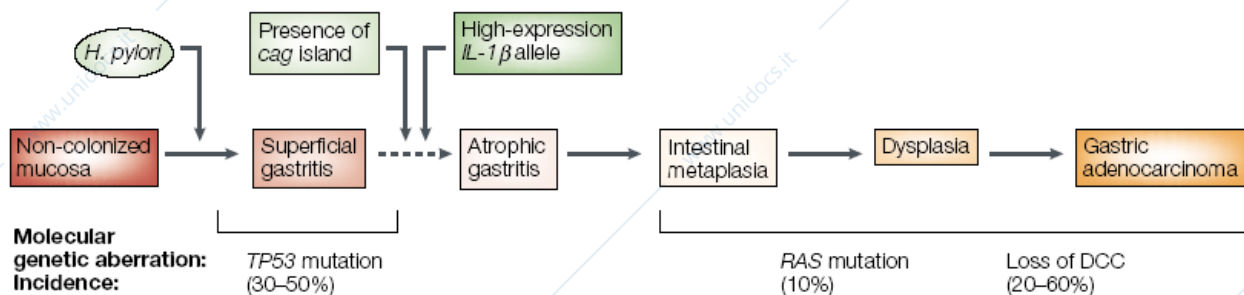
Normalmente instaura infezione acuta nella mucosa gastrica perciò può essere debellato: viene curato bene con gli antibiotici. Molto spesso è silente, ma l'infezione diventa cronica dando luogo a gastrite che si evolve a ulcera. A seconda della localizzazione l'infezione può essere gastrica o

duodenale e può portare a una gastrite trofica o atrofica, dipende dalla suscettibilità delle persone. Si evolve a displasia, metaplasia e poi ulcera, fino ad arrivare al carcinoma.

L'infezione da *Helicobacter pylori* induce un'iperproliferazione delle cellule dell'epitelio gastrico. Il batterio è stato completamente clonato e sequenziato, vedendo che produce 1550 geni di cui 62 correlati con la patogenesi. 40 di questi geni sono stati associati alle *Cag pathogenicity island* (assenti nel batterio isolato dall'uomo) che contribuiscono alla patogenicità e tumoricità. Marshall e Warren ricevettero il Nobel nel 2005 per aver scoperto la correlazione tra questo batterio e l'ulcera gastrica.

Le proteine associate al tumore gastrico sono VacA e CagA, BabA2 e FliA. Rappresentano i ceppi più propensi a dare tumore. Il tumore quando si sviluppa è un evento a steps progressivi: più oncogeni devono essere attivati nel tempo, si sviluppa una gastrite superficiale associata a un'infezione da questo batterio che ha già una mutazione a *p53* (oncosoppressore) nel 30-50% dei casi e a *ras* (si perde la capacità ATPasica) nel 10%,

mentre nel 20-60% dei casi abbiamo la perdita di DCC (*deleted in colorectal cancer*), un gene che è delecto (oncosoppressore) nel cancro al colon.



La cura sono gli antibiotici e la diagnosi inizia con il test del respiro. Siccome il batterio produce ureasi, si fa ingerire dell'urea marcata al carbonio al paziente e dopo mezz'ora si vede se espira CO₂. La persona viene fatta soffiare in una provetta prima di bere l'urea, dopo di che lo si fa respirare in un'altra provetta e si manda al centro che analizza il gas per vedere se le due espirazioni sono diverse. Il tutto si verifica sempre con gastroscopia.

Papilloma virus

È un virus che ha un tropismo per le cellule epiteliali può invadere la superficie cutanea dalle verruche o dal muco. L'infezione è trasmessa per via sessuale, è la più comune: il 50% delle donne sessualmente attive hanno infezione dopo 2 anni dall'inizio della vita sessuale. È molto difficile da prevenire, il rischio di contrarlo sulla popolazione è dell'80%. Il tumore alla cervice uterina è stato il primo riconosciuto dalla WHO come tumore contratto da virus. Causa inoltre l'84% dei tumori all'ano, il 70% di quelli alla vagina, 47% di quelli al pene, 40% dei tumori, ma anche il 36% dei tumori all'oro-faringe e il 23% di quelli al cavo orale.

Il virus è icosaedrico e formato da 72 capsomeri, 6 esoni e 12 pentoni. L1 e L2 sono le proteine strutturali del capsido di 55 e 70 KDa. L2 è quella espressa in minor quantità (20%). Sono le due proteine usate per il vaccino, si trovano localizzate solo sulla superficie del virus.

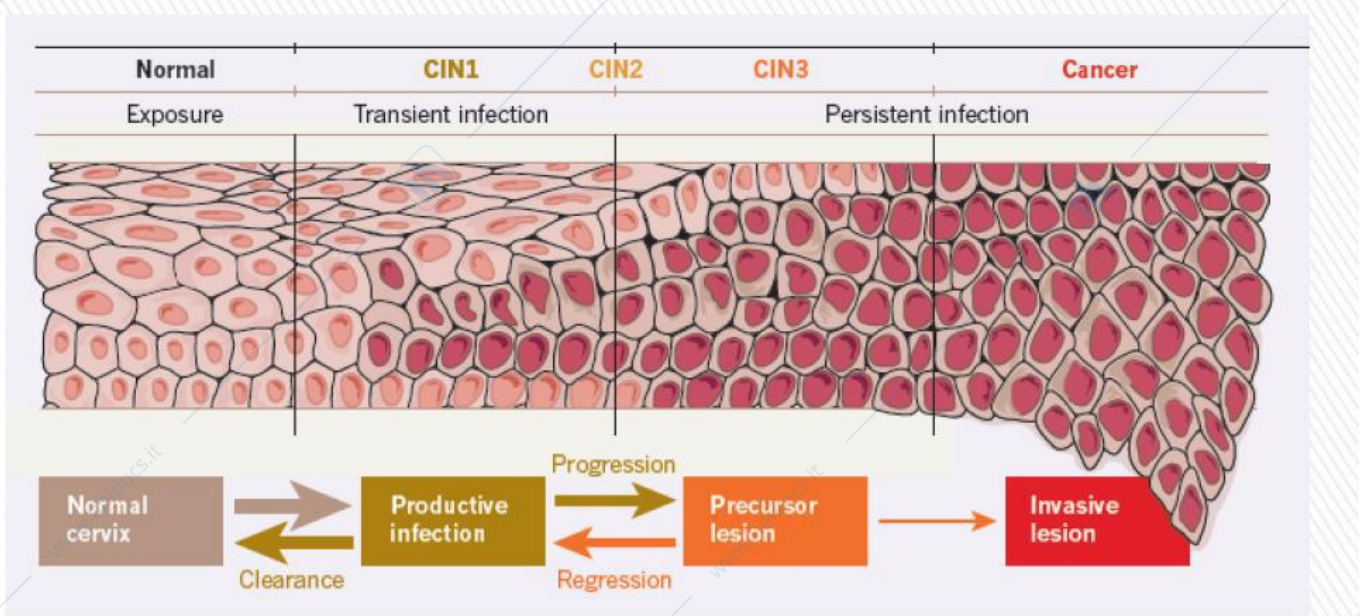
A livello dell'oncogenità invece troviamo E6 e E7. Sono le proteine *early* più importanti, coadiuvate da E1, E2, E4 ed E5.

Il virus infetta le cellule dello stato basale (perché sono quelle che si moltiplicano e quindi quelle di cui ha bisogno), fa l'un-coating, si libera dal capsido, fa trascrivere le proteine *early* nelle cellule epiteliali che stanno crescendo e differenziando. L'iperproliferazione benigna della zona forma una verruca nel tessuto epiteliale cutaneo, mentre produce un rigonfiamento giallastro sulla mucosa anale, vaginale o uterina. Neello strato granuloso inizia la sintesi del capsido perché si stanno producendo nuove particelle infettanti e quindi nuovi virioni.

L'infezione può essere dovuta a scarsa igiene, circoncisione, comportamenti sessuali etc.

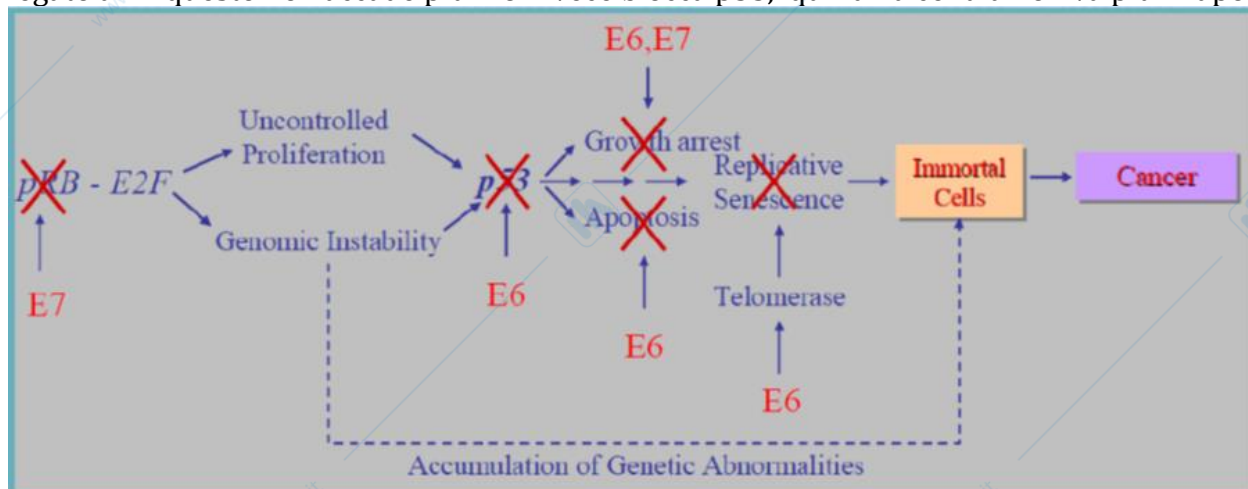
Il fenomeno può essere reversibile per effetto della risposta immune e della suscettibilità genetica. Si può avere la *clearence* che riporta il tessuto al suo stato normale, ma ci possono essere dei fattori virali coinvolti: se ci sono virus che si integrano nel DNA la cellula può essere

facilmente distrutta ed eliminata così da non avere infezioni. L'infezione può progredire fino ad avere lesioni precancerose, da cui si arriva al cancro invasivo che non è reversibile. Alcuni dei fattori pro-carcinogeni sono il fumo, l'immunodepressione, le gravidanze e l'uso (anche in passato) di contraccettivi orali.



Il passaggio da una cervice infettata e una cervice carcinosa si può vedere con il *Pap test* (introdotto nell'87) che permette di individuare anomalie cellulari e curarle. Si identificano le lesioni a livello della cute vaginale e si fa la coniugazione (intervento chirurgico della zona dove si ha la mucosa alterata). Il passaggio da una cervice normale all'infezione transiente si può monitorare andando a vedere la citologia del tessuto. I diversi CIN di proliferazione (*Cervicale Intra-epitelial Neoplasia*), ci dicono il livello di displasia e a quel punto il ginecologo richiede l'intervento terapeutico adatto alla lesione da curare. Un altro aspetto da tenere in considerazione è legato al tipo di virus.

Il virus può essere benigno, ad esempio le verruche in cui il DNA del virus rimane episomiale. Mentre quando il DNA si integra al DNA della cellula ospite, le proteine early E6 e E7 sono in grado di interagire con le proteine dell'ospite e vanno ad inattivare due oncosoppressori: p53 e Rb (gene del retinoblastoma). Le proteine prodotte da p53 e Rb vengono bloccate. Rb normalmente si lega al fattore trascrizionale E2F, che blocca più la cellula in fase S, ma se viene legato a E7 questo non accade più. E6 invece blocca p53, quindi la cellula non va più in apoptosi.



L'effetto carcinogeno è tipico: quando abbiamo il DNA esogeno virale che si riproduce avremo la guarigione se il sistema immune ha il sopravvento, mentre invece quando le due proteine si integrano si va al tumore. Non tutti i ceppi di PV inducono tumore: il tipo 16 e 18 sono i più

tumorigenici specialmente se si associano, motivo per cui nel vaccino vengono usati questi sottotipi.

Questo tumore può essere prevenuto, diagnosticandolo con il *Pap test*.

Il vaccino è stato fatto con la metodologia del VLP (*Viral Like Particles*): particelle simili a virus da cui è stato clonato il gene delle proteine V1, amplificato nel DNA di una cellula ospite (lievito) che ha iniziato a produrre delle particelle simile al virus (senza però contenere all'interno il genoma virale). Si conoscono le varianti che danno immunogenicità.

Ci sono due tipi di vaccino: il vaccino quadrivalente *Gardasil* prodotto dalla Sanofi includente le proteine L1 dei tipi 5, 11, 16 e 18 che coprono il 70% dei casi di CIN 2/3 e cancro cervicale. Sono prodotte dal lievito *Saccharomyces Cerevisiae* con aggiunta alluminio idrossifosfato solfato come adiuvante, lo stesso usato contro tetano. Si fanno tre dosi, al tempo 0, dopo 2 mesi e dopo 6. C'è anche un vaccino equivalente della GlaxoSmithKline, chiamato *Cervarix*, fatto per i virus 18 e 16. Questi sono prodotti nelle cellule di insetto che hanno un vettore particolare (Baculovirus vector). Gli adiuvanti sono alluminio idrossido e monofosforil lipide A-MPL. La vaccinazione viene consigliata a 12 anni e vale sia per maschi che per femmine. E' stata inserita nel calendario nazionale. Il Consiglio Superiore della Sanità (conferenza stato-regioni perché ogni regione può deliberare liberamente quando offrire un vaccino, da che età e fino a quale età lasciare che siano gratuiti) voleva arrivare alla copertura del 95% della popolazione entro i 5 anni dell'avvio della vaccinazione, nel piano nazionale 2012-2014 la copertura vaccinale è al 70%.

Tumori ereditari

Le persone con un cancro ereditario hanno più rischio della popolazione media di sviluppare tumore e solitamente prima dei 50 anni. Il tumore ereditario è meno comune nella popolazione in generale.

Cancro al seno

E' il più frequente per incidenza femminile, è all'80% un'infezione sporadica, 5-10% ereditario e 10-15% familiare. I geni coinvolti nell'andamento familiare sono BRCA1 e BRCA2 (*BReast Cancer*).

La caratteristica dei tumori ad andamento familiare è che hanno un esordio precoce perché si manifestano nelle persone giovani e ciò ci indica che il gene è alterato dalla nascita. Le mutazioni sono tantissime, addirittura 2600 mutazioni sono associate alla trasformazione di questi due geni che codificano due fosfoproteine.

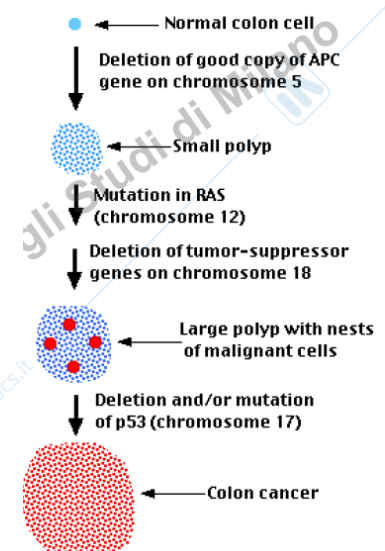
BRCA1 è anche un fattore di trascrizione, mutata nel 45% dei casi, mentre BRCA2 muta solo nel 45%. La prima è codificata nel cromosoma 17, mentre la seconda si trova nel 16. La mutazione si trasmette in maniera autosomica dominante, quindi il 50% dei figli dei portatori può contrarlo. Normalmente la frequenza di portatori varia da 1:500 e 1:1000 (nella popolazione caucasica). Si è studiata la popolazione degli ebrei Ashkenazi, i cui individui non hanno molti incroci al di fuori della loro popolazione e si è notato che le mutazioni sono 1 su 40- 1 su 50.

Poliposi familiare del colon

E' un delezione del gene APC (*adenomatous polyposis coli*) che partecipa alla formazione de fuso mitotico durante la mitosi cellulare. Il gene si trova sul cromosoma 5, la sua delezione comincia a formare dei piccoli polipi al colon che sono ancora benigni, ma possono aggravarsi aumentando in numero e diventando maligni se si aggiungono le delezione del gene oncosoppressore MCC (cromosoma 18), le delezioni di p53 (cromosoma 17) e le mutazioni di *ras* (cromosoma 12).

Diagnosi tumorale

La diagnosi inizia dopo l'anamnesi vedendo cosa produce il paziente. **Diagnosi di tipo radiografico:**



- Raggi X,
- Risonanza magnetica nucleare,
- TAC
- Ecografia se il tumore è già evidenziato. La mammografia è una radiografia che diagnostica efficacemente.

Diagnosi istologica.

- Biopsia. Prelevando del tessuto tumorale attraverso una gastroscopia, un broncolavaggio o un'agobiospia se i tessuti sono molli.
- Agoaspirato.
- Striscio citologico, come il *Pap test*. Si prepara il vetrino del tessuto colorato e si interviene con diversi studi citologici che ci dicono a che livello di espressione tumorale siamo, quali geni vengono espressi e a che stadio siamo.

Diagnosi molecolare. Anche i metodi molecolari partono dalla biopsia, si vede a livello genetico quali geni sono mutati, quante cellule hanno questa mutazione etc. Sono metodi che non prescindono dalla biopsia, ma si stanno affinando le tecniche per avere i tessuti.

Una neoplasia è clinicamente rilevante quando abbiamo un diametro di 1mm, 10^9-10^{10} cellule e un tumore palpabile e/o visibile che ci dice che potrebbero già essere passati 3-10 anni dall'infezione iniziale.

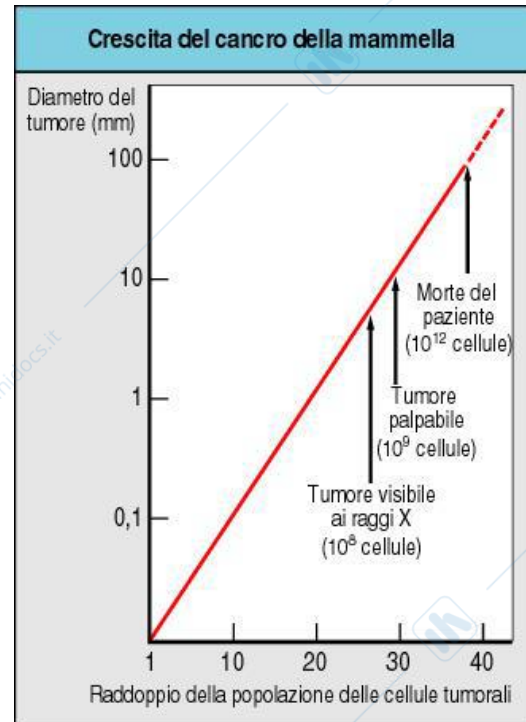
Sintomi che possono far sospettare la presenza di un tumore e quindi devono essere accertati:

- Un addensamento o un nodulo palpabile sotto la cute;
- Una modificazione evidente di un neo o di una verruca;
- Un'ulcerazione che non si rimargina;
- Una tosse stizzosa o raucedine;
- Modificazioni delle abitudini intestinali o della minzione;
- Difficoltà nella digestione o nel deglutire;
- Modificazioni del peso in assenza di una causa evidente;
- Sanguinamenti o perdite non fisiologiche;
- Prurito generalizzato senza allergia o intolleranze.

La biopsia è il prelievo di un frammento di tessuto per l'esame citologico ed è indispensabile. Si può fare con un ago per il tumore alla mammella o prendendo il liquido pleurico. Si può fare durante un intervento chirurgico, per via ambulatoriale o prelevare un campione durante un intervento e fare una diagnosi mentre il paziente è ancora in sala operatoria. Il campione viene congelato per poter essere tagliato, fissato con formalina e incluso in paraffina che viene raffreddata per poter sezionare il campione. Deve essere fissato prima che si degradi, ma se si congela in azoto liquido viene tagliato e analizzato all'istante per poter intervenire durante l'operazione al paziente.

Lo striscio è usato nel *Pap test*, nell'analisi delle cellule di peritoneo o nelle cellule del sangue. Una volta fatta la diagnosi e l'intervento chirurgico, per la stadiazione dei tumori si usa il TNM (*Tumor Nodes Metastasis*) che si basa sulla dimensione e invasività del tumore primario. Si vede se c'è metastasi e si associa un numero in base alle dimensioni (o alla profondità) del tumore (T indica che la classificazione riguarda il tumore primitivo):

- Tis è il carcinoma in situ.
- T0 vuol dire che nell'intervento non sono state evidenziate metastasi,



- TX se il tumore non può essere valutato.

Con N invece si indica la diffusione dei linfonodi regionali, mentre M indica invece le metastasi. Le classificazioni possono essere morfo-funzionali, si cercano i marcatori umorali, si vede la cinetica di crescita (si vede se crescono in vitro e come) e si usano i marcatori molecolari. Lo studio della cinetica di crescita è stato sostituito da queste nuove tecniche. È importante stabilire lo stadio del tumore perché se alla diagnosi iniziale siamo allo stadio 1 abbiamo una possibilità di vita di 5 anni, mentre se siamo a stadi successivi le possibilità di vita diminuiscono di molto. Il grado di differenziazione delle cellule si vede con il *Grading*. Questa tecnica diagnostica ci dice lo stadio di differenziazione del cancro e il numero di mitosi presenti: se le cellule sono molto differenziate rispetto al tessuto normale, la prognosi è molto infausta rispetto a tumori non differenziati.

I marcatori tumorali sono proteine identificabili nel sangue (o in altri liquidi biologici) che rendono la diagnosi poco invasiva in quanto aumentano in modo significativo in corrispondenza del tumore. L'antigene prostatico è un esempio di **marker specifico**, è un antigene espresso a bassa concentrazione negli individui sani, ma aumenta con l'età in funzione dell'ipertrofia prostatica. È il corrispettivo dell'analisi del tumore al seno.

Un esempio di **marker di differenziazione** è invece il CEA (Antigene Carcino-Embrionale) presente negli embrioni fisiologicamente che torna ad essere presente nei tumori, specialmente in quelli del tratto digerente.

Nella diagnosi istologica sono molto usati gli anticorpi monoclonali che permettono una diagnosi più precisa evidenziando anche tumori poco o non differenziati, dicendoci inoltre lo stadio (ogni stadio ha un fenotipo). Permettono anche di determinare il sito di origine di tumori metastatici. Ad esempio, a livello dei tumori polmonari, arrivano prima delle metaplasia ossee. Per questo la citologia è importante. Normalmente l'espressione di *bcl-2* in un linfonodo normale è bianco, nel linfoma follicolare invece si pone al centro colorato. Così come nell'espressione di *p53* in un adenoma intestinale le cellule diventano rosse. Nel tumore alla mammella si vede espresso l'oncogene *erb* sulla superficie. Alcuni dei markers tumorali più importanti sono

- AFP (α -fetoproteina);
- CEA (antigene carcinoembrionale), associato ai tumori del tratto intestinale colon-retto;
- CA 125, specifico nei tumori ovarici;
- CA19-9: produce carcinoma gastro-intestinale - GICA, ma si trova anche nel tumore colon-retto;
- CA 15-3, neoplasie della mammella;
- TPA (antigene polipeptico tissutale), presenti in carcinomi a stomaco polmoni, colon-retto, pancreas
- PSA (antigene prostatico specifico). Normalmente presente nel liquido spermatico, indicativo di neoplasia sopra i 10 ng/mL mentre evidenzia malattie (come prostatite o iperplasia prostatica) benigne al di sotto.
- HCG (gonadotropina corionica umana) si trova in neoplasia dell'ovario e del testicolo.

La diagnosi molecolare può avvenire attraverso FISH e PCR (per evidenziare trascritti di oncoproteine di fusione). Permettono di determinare la malattia residua, diagnosticare la predisposizione ereditaria e genotipizzare mediante microarray.

MALATTIE DEL SISTEMA VASCOLARE

Le malattie cardiovascolari sono la prima causa di morte a livello mondiale, il 44% dei decessi in Italia. Il paziente che sopravvive ad un attacco cardiaco diventa un malato cronico. Queste malattie portano a cardiopatia, ischemica ed accidenti cerebrovascolari.

Malattie arteriose: L'arteriosclerosi

Il termine è abbastanza generico e significa sclerosi delle arterie, è l'indice di un ispessimento e irrigidimento della parte delle arterie. L'ipertensione ed il diabete sono tra le principali cause di questa patologia che provoca riduzione del diametro del lume e dell'elasticità della parete con conseguente riduzione del flusso ematico ed ipossia tissutale.

Aterosclerosi si riferisce alla formazione di un'ateroma (ispessimento della parete arteriosa) detto anche placca aterosclerotica. "Ather" in greco significa farina, il termine si riferisce all'aspetto che assume la parete vascolare nella patologia.

Sclerosi calcifica, detta anche carcinoma della tonaca media, è un irrigidimento, calcificazione della tonaca media di arterie di medio e piccolo calibro.

Arteriosclerosi: si tratta sempre della degenerazione ialina e fibrinoide della parete delle arteriole ma si associa ad ipertensione maligna.

Le arterie di grosso calibro, o elastiche, sono caratterizzate da una tonaca intima (che forma il lume) formata dall'endotelio ricoperto dalla membrana elastica interna, seguita da una tonaca media di cellule muscolari lisce, una seconda membrana elastica e infine una tonaca esterna (o avventizia) che comprende i vasi e l'innervazione.

Nelle arterie muscolari mancano le membrane elastiche, ma il resto della struttura rimane invariato. Le arteriole sono i vasi più semplici: hanno uno strato di cellule muscolari lisce più sottile. I capillari infine sono costituiti solo da cellule endoteliali e membrana basale. Dai capillari si passa direttamente all'apparato venoso caratterizzato da meno tonache muscolari ma con valvole e contrazioni (muscolari) che consentono al sangue di andare contro la forza di gravità.

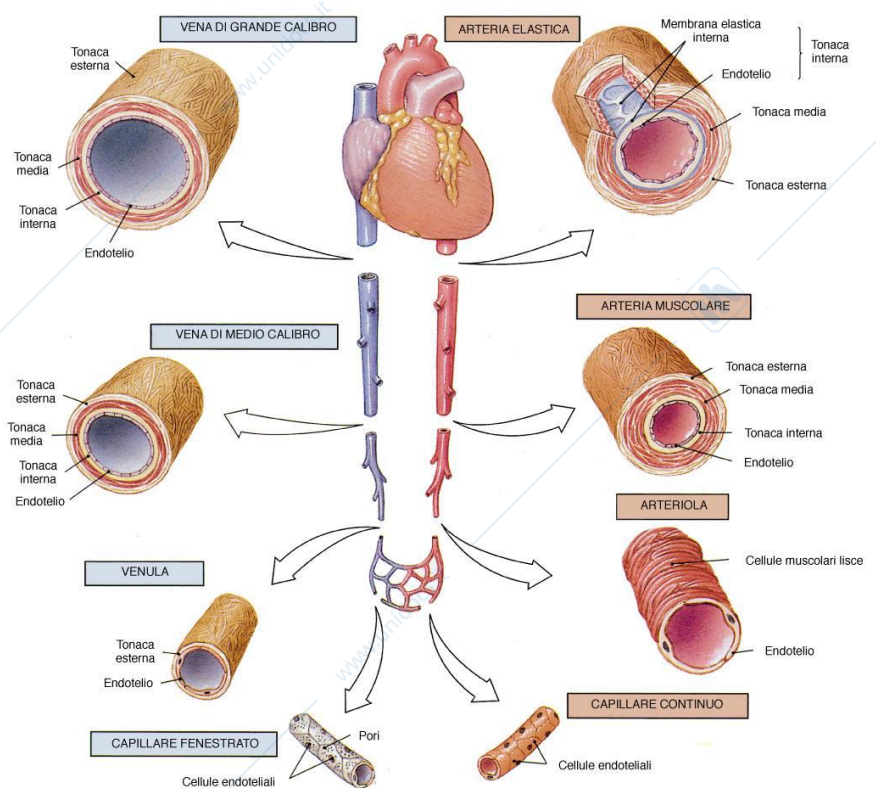


FIGURA 9-4. Istologia dell'apparato circolatorio.

Parliamo di arteriosclerosi per le arterie elastiche e muscolari. Il termine fu coniato da Ross nel 1933: è la principale causa di attacco cardiaco, ictus cerebrale, gangrena delle estremità e del 50% della mortalità in US, Europa, Giappone e India. Le lesioni, dette ateromi o placche aterosclerotiche, derivano da un'eccessiva risposta infiammatoria fibro-proliferativa da varie forme di danno all'endotelio e alla muscolatura liscia vasale.

Avremo un'inflammatione cronica con l'azione dei macrofagi utili a mantenere la placca. Al processo partecipano molti fattori di crescita e molecole vasoregolatriche, ma ci sono anche molte citochine che richiamano fibroblasti per produrre collagene irrigidendo l'endotelio.

La risposta infiammatoria ha inizio da un danno dall'endotelio nella membrana basale che poi si trasmette su tutta la parete basale (ma ha inizio dalla tonaca intima).

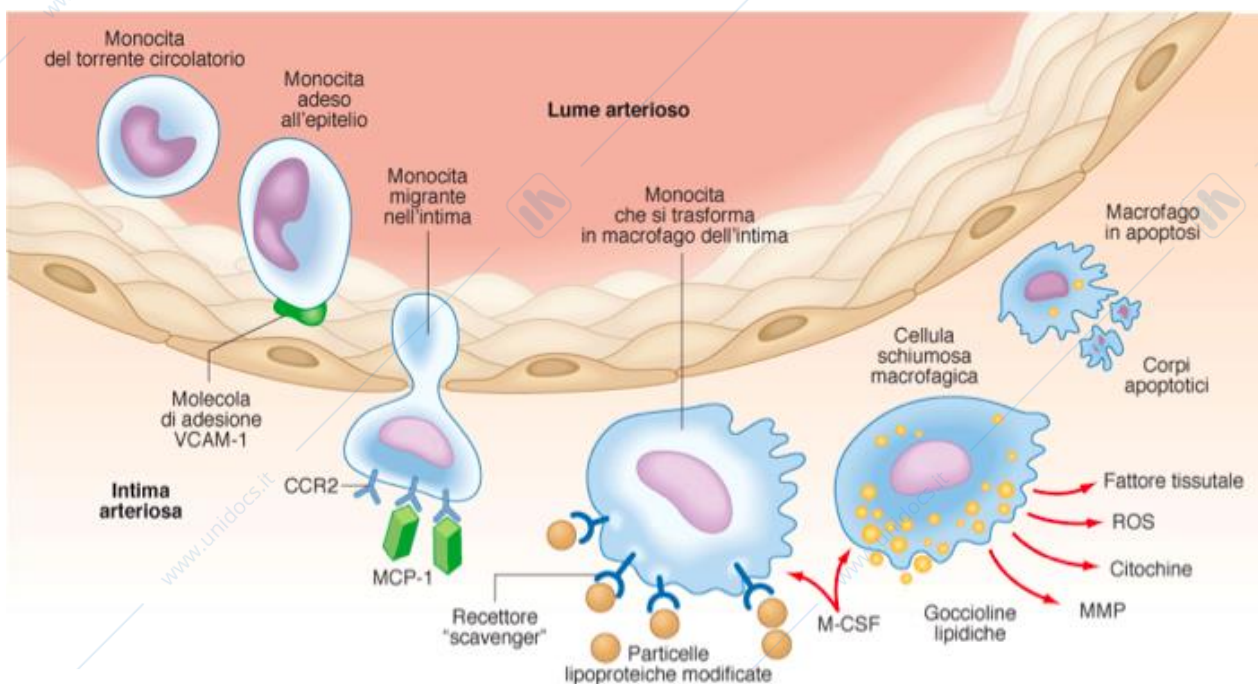
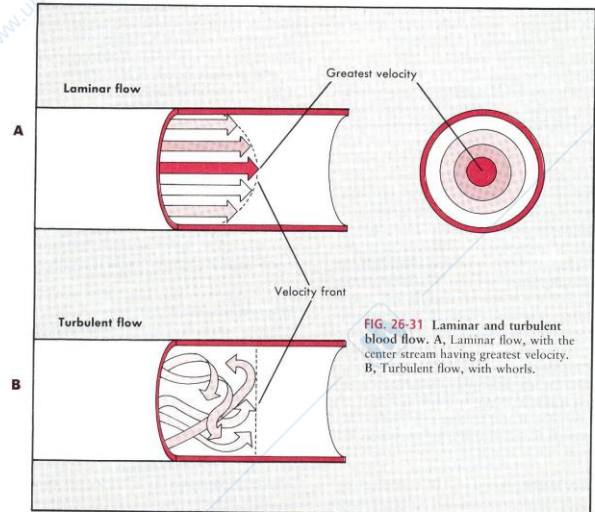
Le cause del danno possono essere:

- **Anatomiche-meccaniche:** in certe zone in cui il flusso sanguigno è turbolento, l'endotelio si può desquamare perché, ad esempio, nei punti di biforcazione dei grossi vasi il flusso non è laminare.
- **Chimico-immunologiche:** deposito di immunocomplessi (antigeni e anticorpi solubili aggregati) che precipitano a livello dei vasi e danno inizio ad un danno. Le cause sono svariate e devono essere associate per dichiarare la patologia.
- **Iperensione:** una pressione troppo elevata sulle pareti vasali induce uno stress meccanico e il vaso risponde al danno provocando un ispessimento della parete.
- **Fumo:** è uno dei fattori esterni più pericolosi. Ha un effetto dannoso tanto a livello cardiovascolare quanto a livello della parete bronchiale.
- **Alterazioni funzionali** come l'aumento di ipersensibilità e un'adesione leucocitaria aumentata.

I fattori che contribuiscono a queste alterazioni sono il fumo di sigaretta, alcune tossine batteriche (se abbiamo un'infezione), delle citochine in eccesso nel plasma e l'ipercolesterolemia (eccesso di concentrazione di lipidi nel sangue).

Meccanismo di azione:

Una zona particolare di arteria subisce un danno, inizia una risposta locale infiammatoria, i monociti vengono richiamati, migrano nel sub-endotelio (questa è sempre la prima causa). Le lipoproteine ossidate (LDL) che contengono colesterolo vengono fagocitate dai macrofagi grazie al recettore "scavenger". Il macrofago internalizza e assume questi lipidi diventando una cellula schiumosa (facendo l'istologia del citoplasma di questa cellula sembra schiuma), il macrofago si attiva, produce citochine e chemochine richiamando altri macrofagi, fibroblasti, cellule della



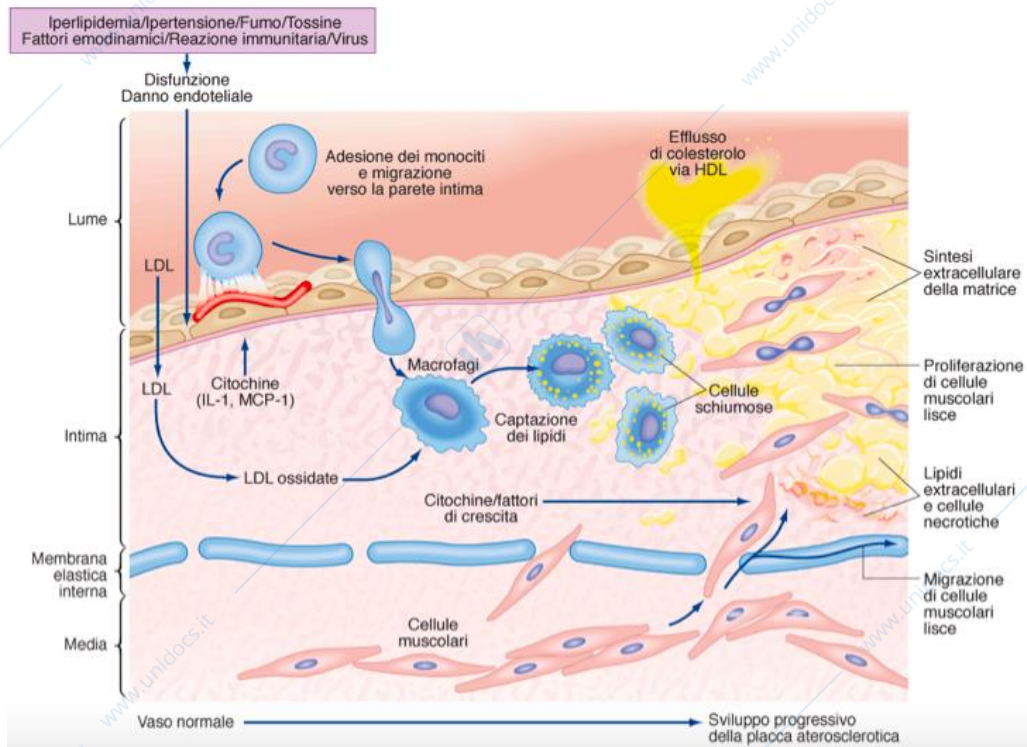
muscolatura liscia.

C'è una riparazione tissutale lenta che si accresce. La prima lesione di questo tipo si chiama "stria lipidica" perché le placche sono giallastre e contengono colesterolo, sia libero che inglobato nei macrofagi. Le strie si ritrovano anche in età giovanile, dipende dalla dieta. Questo tipo di lesione può essere reversibile perché non c'è stato ancora un grosso richiamo di altre cellule.

Se i fattori di rischio continuano (ipercolesterolemia, obesità, fumo, ipertensione e età), le cellule schiumose richiamano le cellule muscolari lisce, i fibroblasti.

L'evento particolare di questa patologia è che migrano le cellule muscolari grazie ad un segnale chemiotattico potente che attiva, stacca e muove queste cellule che vanno a formare la placca. I fibroblasti sono cellule abbastanza mobili, molto presenti nell'interstizio e quindi facilmente richiamabili.

La tonaca intima inizia ad ispessirsi per accumulo di lipidi, macrofagi, fibroblasti e colesterolo libero. La superficie dell'ateroma rimane sub-endoteliale e protegge la placca che sta crescendo all'interno del vaso. Questo rallenta il flusso sanguigno, ma finché la placca rimane con l'endotelio intimo non ci sono grossi problemi. Se invece l'endotelio si danneggia e si sfalda, arrivano subito le piastrine che cercano di rimediare al danno. Siccome ci troviamo in zona intravasale il vaso è integro, quindi non si parla di coagulo ma di trombo anche se entrambi i



problemi sono emostatici. Il trombo è sempre patologico perché si forma a vaso integro, ci sono problemi di coagulazione.

I trombi parietali sono piccole lesioni della parete del vaso che vengono disciolti dalla plasmina, l'enzima che disgrega la fibrina (che forma il trombo).

La placca fibro-adiposa è quindi bianca-giallastra (il colore dovuto dai

lipidi liberi) e protrude verso il lume vasale. Più placche possono convergere per dare masse più evidenti. In sezione istologica, la placca è interamente coperta di cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e macrofagi con lipidi.

Tutte le cellule dell'ateroma non riescono ad avere sufficiente ossigeno per diffusione dal vaso, si creano zone ipossiche che inducono la formazione di nuovi vasi (neoangiogenesi) ma alcune cellule vanno in necrosi. Questa placca è detta "lesione complicata", è friabile perché si possono staccare dei pezzi a causa del flusso persistente che iniziano a circolare dei tromboemboli che ostruiscono vasi più piccoli e capillari.

Gli effetti clinici sintomatologici delle placche sono molto subdoli perché, essendo in vasi

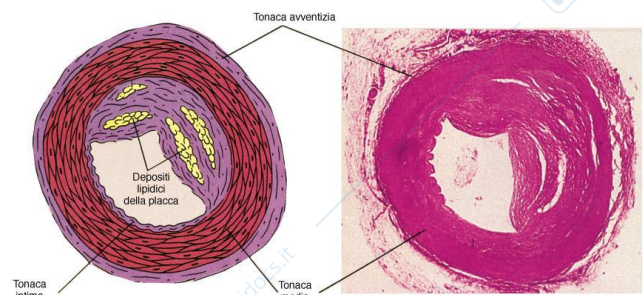


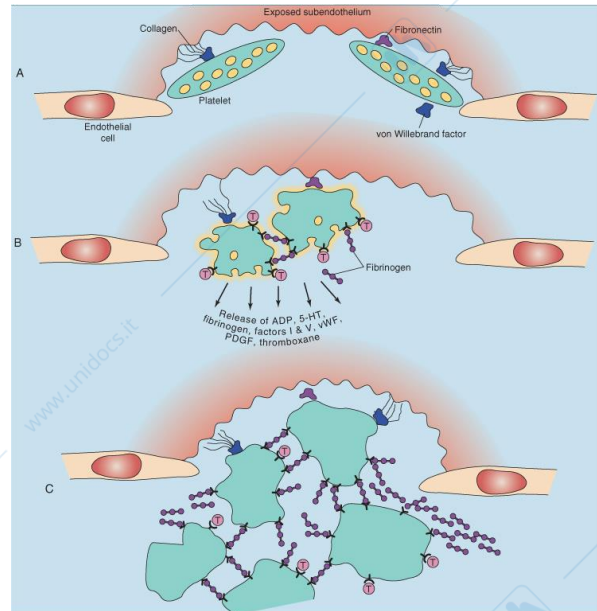
FIGURA 9-5. Una placca che ostruisce una arteria periferica. (MO, x36).

grossi, finché non hanno dimensioni notevoli il problema non si evidenzia. La stria lipidica si può trovare anche nei bambini e la lesione complicata può avere 30-40 anni di sviluppo, può essere alimentata da attori genetici.

Il primo evento visibile è la **trombosi**: formazione del trombo inizialmente parietale che se la placca si è accresciuta di molto, occupa un terzo o il 50% del lume di un vaso. La formazione di trombo può essere molto veloce: il flusso rallenta, si collegano le piastrine e si arriva in pochi minuti al trombo occludente che si tramuta in un'ischemia a valle. Abbiamo in successione: danno endoteliale, adesione di piastrine e attivazione della coagulazione.

Il trombo può diventare un trombo-occludente per sé oppure può disgregarsi grazie alla plasmina (che è sempre in circolo) formando trombo-emboli che occludono vasi di minor calibro. Gli ictus cerebrali sono spesso dovuti a trombo-emboli, è difficile che ci siano degli ateromi intra-cranio (anche se non si escludono).

Tra le complicanze abbiamo il **trombo** e l'**embolo**. I due si differenziano dal fatto che l'embolo è di materiale solido, proveniente da un altro vaso e spinto in uno più piccolo che ne risulta ostruito. L'embolo è spesso un frammento di trombo (aggregazione di piastrine, fibrina e elementi cellulari).



Altre lesioni complicate sono la **calcificazione della ateroma**: la idrossiapatite (minerale che forma le ossa) si deposita da cellule, i periciti, che migrano nella placca e grazie alle citochine differenziano in osteoblasti. I periciti sono pluripotenti e si possono differenziare in fibroblasti, cellule della muscolatura liscia grazie al fattore PDGF (fattore di crescita delle cellule piastriniche) oppure diventare osteoblasti con il fattore TGF- β (Linfocina prodotta dai T reg). La parete di un vaso dovrebbe essere flessibile e mobile, in questo caso è già ispessita e si irrigidisce ulteriormente a causa dei nuclei di calcificazione che rappresentano un punto di rottura più semplice.

La **neovascolarizzazione di placca** può portare all'**emorragia nell'intima**: quando la lesione è molto complicata e abbiamo già calcificazioni, la zona di necrosi richiama angiogenesi inducendo le cellule endoteliali dei vasi dell'avventizia (che irrorano tutta la parete dell'arteria) a formare nuovi vasi. La vascolarizzazione della placca è fisiologica perché le cellule che stanno lì richiamano fattori, ma questi nuovi vasi non possono anastomizzare, quindi possono andare in contro ad un'emorragia (emorragia intinale) portando una grande quantità di sangue libero nella placca che fa aumentare il volume diventando causa di morte improvvisa.

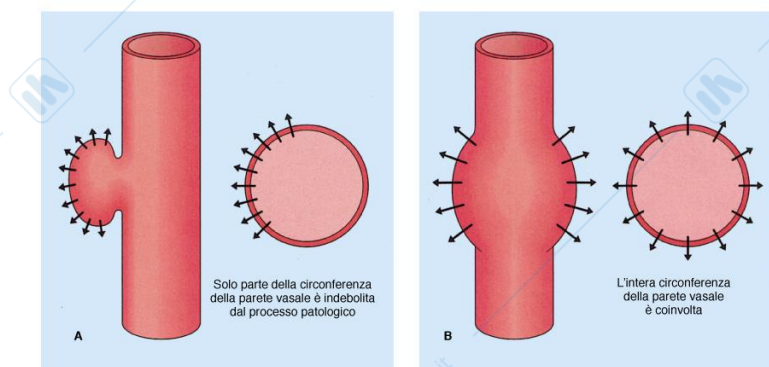


FIGURA 9-20. (A) Aneurisma sacciforme. (B) Aneurisma fusiforme.

Gli **aneurismi** sono una dilatazione localizzata di un'arteria che si forma a causa di un indebolimento della parete vasale dovuta ad arteriosclerosi, ipertensione o anomalie congenite (dalla nascita). Questo fenomeno si complica se l'aneurisma si rompe a causa della troppa pressione. Se l'aneurisma si trova sull'aorta addominale possiamo avere morte per emorragia interna. Inoltre, gli aneurismi predispongono alla trombosi e possono occludere per schiacciamento gli altri vasi. Gli aneurismi possono essere sacciformi o fusiformi. Se c'è una placca poco prima dell'aneurisma il sangue che arriva dal cuore trova un ostacolo e per passare aumenta la pressione sulle pareti del vaso che tendono a sfiancarsi. In un aneurisma di questo tipo, il sangue continua a fluire al centro (dove ha spazio) ma sui lati dello spazio si coagula, quindi trombizza. Un aneurisma anche se non occlude, causa la trombosi. Aneurismi di questo tipo su vasi cerebrali, sono solitamente congeniti e non si manifestano normalmente. Tutte le conseguenze della placca derivano dalla mancanza di elementi nutritivi a valle della placca.

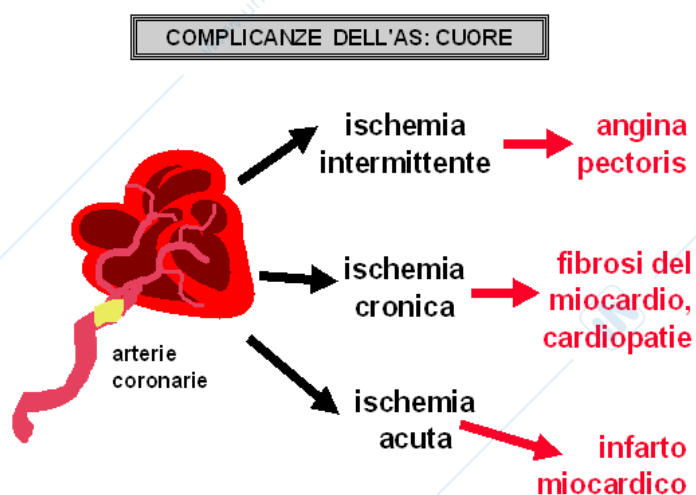
Queste placche possono causare danni in diversi distretti anatomici:

- Nei reni a causa della separazione delle arterie renali. Un rene da un lato si atrofizza perché non riceve più sufficiente nutrimento e l'altro invece si ipertrofia.
- All'intestino possiamo avere problemi funzionali se la parete intestinale subisce ipossia, il tessuto dopo la placca viene meno irrorato.
- A livello cerebrale e nelle arterie intracraniche si forma un'aneurisma tra la carotide comune e quella interna, con un'ecografia si vede bene lo spessore della carotide esterna per diagnosticare la presenza di placche.
- Alle gambe, come spesso accade all'arteria tibiale e alla poplitea. Se non arriva abbastanza sangue alle gambe, la circolazione è ridotta e quindi si hanno dolori. L'arteriosclerosi alle estremità è anche una delle cause del "piede diabetico", quando una persona con diabete ha una lesione o una circolazione alterata a livello del piede questo va in necrosi, abbiamo la gangrena con lesioni irrecuperabili che comportano l'amputazione del piede.
- Nel cuore le placche si formano sulle coronarie causando gli infarti cardiaci.

Le manifestazioni cliniche derivano sempre dalla diminuzione di apporto sanguigno in periferia. Come sintomi abbiamo una pelle atrofica, lucente, tirata e disidratata (l'invecchiamento è infatti un ispessimento della parete), le unghie opache, le estremità fredde e la diminuzione del polso periferico. Se l'ipossia è importante, si arriva all'ischemia muscolare (*claudicatio intermittens*) ovvero l'incapacità di deambulare per il dolore.

A livello cerebrale, le zone di ipossia possono essere anche transitorie e dare confusione mentale, vertigini, instabilità mortoria e occasionale perdita di coscienza. A livello cardiaco abbiamo delle fasi di ischemia intermittente, ovvero i rami più piccoli delle arterie coronarie vanno incontro ad ischemia, solitamente durante uno sforzo importante. Il muscolo chiede ossigeno che non arriva e quindi fa male.

L'*angina pectoris* è un dolore al petto scatenato da un'intensa attività muscolare o da uno stress (anche passare al freddo dopo aver mangiato), se è una forma stabile passa mettendosi a riposo e prendendo vasodilatatori (nitroglicerina). Se il fenomeno invece non passa e diventa insistente è bene farsi fare un elettrocardiogramma, potrebbe essere l'inizio di un infarto. Provoca una sensazione di soffocamento e morte imminente, dovuto solitamente ad anossia miocardica, sforzi eccitazioni.



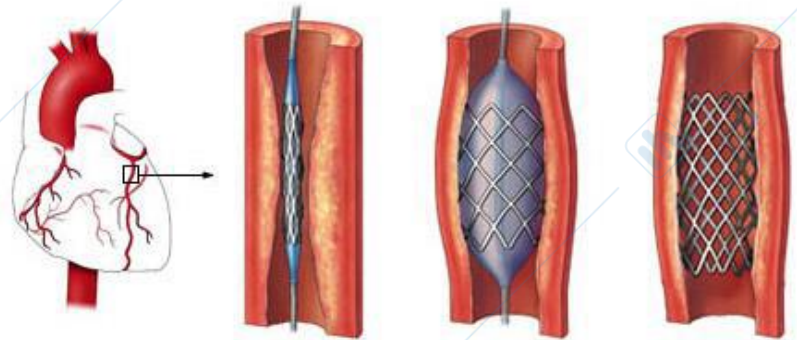
L'**infarto** consiste in un'area di necrosi coagulativa in un tessuto dovuta a ischemia locale che avviene per l'ostacolo alla circolazione in quell'area più comunemente per un trombo o un embolo.

L'**ictus** si verifica di solito a livello cerebrale, può avere un inizio improvviso ed è dovuta ad emorragia per rottura di un aneurisma, embolia o dovuto ad una trombo occlusione. Può portare a paralisi, stordimento, vertigini, disatria e può interessare le zone del cervello del linguaggio portando ad afasia. Spesso ne conseguono danni neurologici permanenti.

Le **T.I.A. (transient ischemic attacks)** sono brevi attacchi di disfunzione cerebrale di origine vascolare, senza deficit neurologico persistente. Si associano a malattie vascolari occlusive, specie a livello della carotide e della basilare. La demenza senile può essere associata ad un'ischemia grave (penultima slide).

Per recuperare una placca arteriosclerotica si pone un palloncino (stent) all'interno delle coronarie. Si fa arrivare un catetere a palloncino attraverso un filo metallico introdotto dall'arteria femorale, si risale sino al cuore, da qui il catetere viene inserito dentro la coronaria. Viene poi gonfiato e mantiene larghe le arterie ripristinando il flusso sanguigno. Per mantenere poi aperta l'arteria, viene posizionato uno **stand**, ovvero una retina metallica che mantiene aperta l'arteria. Questa non digerisce l'ateroma, ma si limita a schiacciarlo. E' sempre associata una terapia che attiva le plasmine e all'assunzione si aspirina a basse dosi che impediscono il coagulo. Un altro metodo è il bypass, si ricongiungono vene che si trovano in zona per formare una nuova arteria da cui far fluire il sangue.

22/04/2016



I fattori di rischio di arteriosclerosi:

- **Età** perché con l'invecchiamento i tessuti si disidratano, i tessuti si ispessiscono e perdono elasticità. Tra i 40-60 anni l'incidenza di infarto del miocardio aumenta di 5 volte.
- **Sesso**: il sesso femminile è meno esposto al rischio perché fino alla menopausa gli estrogeni producono fattori che proteggono i vasi e il metabolismo del colesterolo. Dopo i 60 anni la frequenza tra i due sessi torna la stessa, pare che la terapia sostitutiva con estrogeni in menopausa riduca il rischio di malattie coronariche.
- **Iperlipidemia**, ovvero i livelli di colesterolo. Il colesterolo e gli esteri del colesterolo (sotto forma di cristalli) sono presenti nelle placche aterosclerotiche, c'è correlazione tra i livelli di LDL plasmatiche e i rischi di malattie coronariche. Anche i difetti genetici nel metabolismo delle lipoproteine causano fenomeni di arteriosclerosi accelerata, specialmente per il recettore Apo-100.
- **Diabete e ipertiroidismo** comportano una variazione dei livelli di colesterolo. Una dieta con elevati livelli di colesterolo produce le placche, questo si vede in laboratorio.

Le **iperlipoproteinemie** comportano una maggior concentrazione di lipoproteine per eccessiva assunzione dalla dieta o errori nella degradazione. Questa è una concausa di patologie gravi come le pancreatiti (malattia severa, a volte fatale) e l'infarto del miocardio. Sintomi secondari possono essere epatomegalia, splenomegalia e xantomi cutanei. Gli xantomi sottocutanei sono ammassi sotto la cute di lipidi che causano protuberanze.

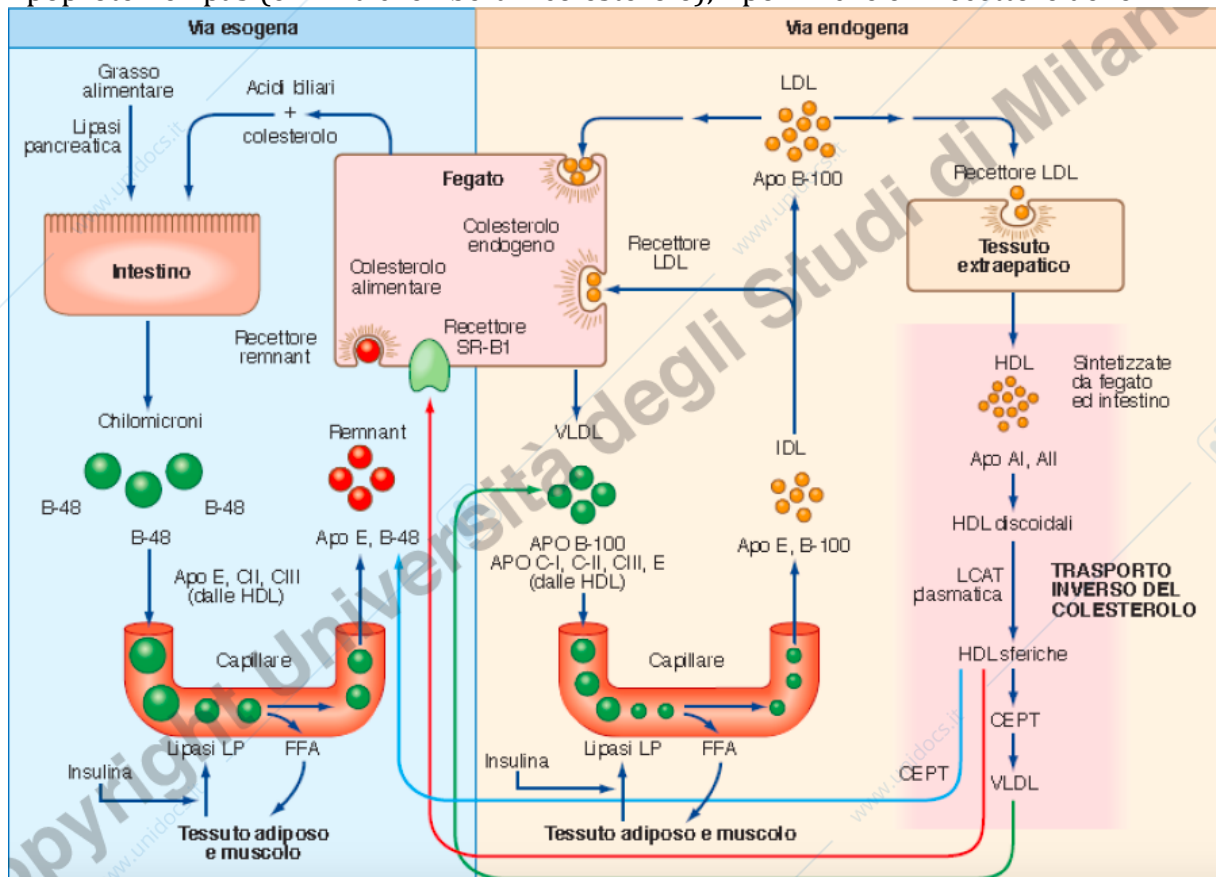
La lipoproteina serve per trasportare lipidi nel torrente acquoso, in natura per trasportare lipidi che stanno al centro della particella abbiamo un involucro polare con fosfolipidi e apoproteine. Queste proteine sono caratteristiche per ogni classe di lipoproteine e servono alla particella per

aderire a un recettore specifico, presente sulle cellule che necessitano di colesterolo. Le diverse classi si dividono in:

- Chilomicroni (CM). Si formano subito dopo i pasti, formano la classe con più trigliceridi.
- VLDL, very low density lipoproteins.
- LDL, low density lipoproteins. Rappresentano la classe con più colesterolo.
- HDL, high density lipoproteins. Contengono prevalentemente colesterolo e pochi trigliceridi.

Le LDL costituiscono il “colesterolo cattivo” perché trasportano colesterolo nel sangue e lo cedono ai tessuti, mentre le HDL estraggono colesterolo dalle cellule e lo portano al fegato per essere degradato.

Le apolipoproteine sono una classe molto estesa di proteine, le più importanti sono: ApoB-100, presente in prevalenza sulle LDL; C1 e C2 (sempre nelle LDL) che sono attivatori della lipoproteina lipasi (enzima che libera il colesterolo); ApoA-1 che è il recettore delle HDL.



I chilomicroni si formano nell'intestino, vengono scissi nel circolo sanguigno e liberano acidi grassi. Questi vengono usati dalle cellule di maggior consumo come il tessuto muscolare. Man mano che vengono scisse si trasformano in proteine di alta intensità, arrivano al fegato e quindi vengono ridistribuite all'organismo. Le LDL hanno Apo-B 100, proteine di superficie che interagiscono nel tessuto epatico. Le LDL vengono internalizzate e usate dalla cellula per il fabbisogno stesso della cellula. Il colesterolo in eccesso viene recuperato dalle HDL, torna in circolo. Queste HDL vengono poi captate dalle loro apoproteine, Apo A1 e Apo A2, e attraverso un processo chiamato “trasporto inverso di colesterolo”, il colesterolo viene ritrasportato dalle HDL sferiche al fegato dove viene metabolizzato.

Il colesterolo è assolutamente indispensabile a tutte le cellule, l'incapacità di sintetizzare il colesterolo (difetto genetico) è molto più grave dell'eccesso perché questa carenza impedisce la crescita di tutte le membrane cellulari (membrana esterna, RER, REL, reticolo del Golgi, membrane dei mitocondri, ecc.). La cellula non può fare a meno del colesterolo, per questo c'è sia l'assunzione dall'esterno sia la sintesi endogena da parte delle cellule.

Le lipoproteine hanno come difetti primari le ipertriglicemie: dopo i pasti nel nostro intestino si formano tanti chilomicroni che contengono molti trigliceridi, questi vengono metabolizzati con

la lipoprotein lipasi. Se questo enzima non funziona, è danneggiato o mutato nel sangue si accumulano chilomicroni e trigliceridi.

Nei deficit familiari di lipoprotein lipasi, malattia autosomica recessiva (ovvero patologia in cui il difetto deve essere presente su entrambi gli alleli perché si manifesti), gli individui malati sono omozigoti per il gene che codifica la lipoprotein lipasi. I sintomi sono dolori addominali causati da pancreatiti dovute all'accumulo di trigliceridi, presenza di xantomi, epato-splenomegalia, iper-chilomicronemie e iper-trigliceridemia.

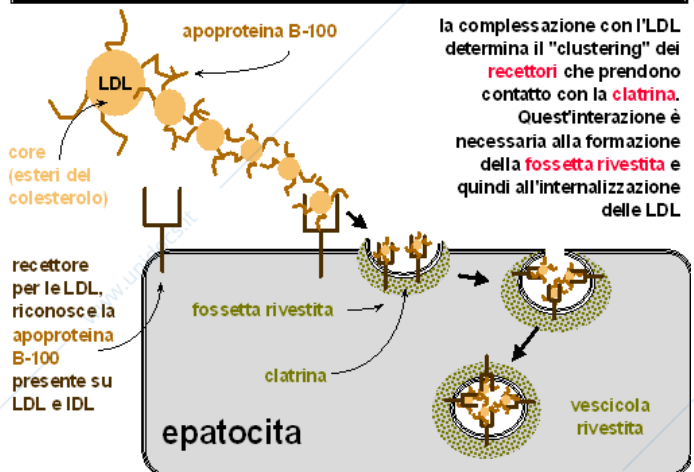
L'ipercolesterolemia familiare (FH), è una malattia autosomica dominante trasmessa da padre a figlio, che ha forti differenze nelle manifestazioni e gravità. Porta una mutazione per il gene che codifica il recettore delle LDL. Queste solitamente interagiscono con il recettore, vengono internalizzate e si formano fossette rivestite di clatrina che formano una vescicola interna, un vero proprio endosoma al cui interno la lipoproteina viene digerita. I fosfolipidi dell'involucro vengono metabolizzati e il colesterolo liberato può essere usato o meno per sintetizzare la membrana, gli ormoni steroidei e gli acidi biliari. Se non viene utilizzato, la cellula lo immagazzina sotto forma di esteri del colesterolo, grazie all'enzima ACAT. Il recettore internalizzato viene riciclato e torna ad essere espresso grazie al Golgi che lo riforma.

Se abbiamo un'eccessiva disponibilità di colesterolo alla cellula dall'esterno, si mettono in atto sistemi di controllo che inibiscono la sintesi di recettore che regolano negativamente la sintesi (espressione) del recettore. L'altro controllo negativo è quello sull'enzima HMG (enzima A reduttasi) che facilita e induce la sintesi endogena di colesterolo.

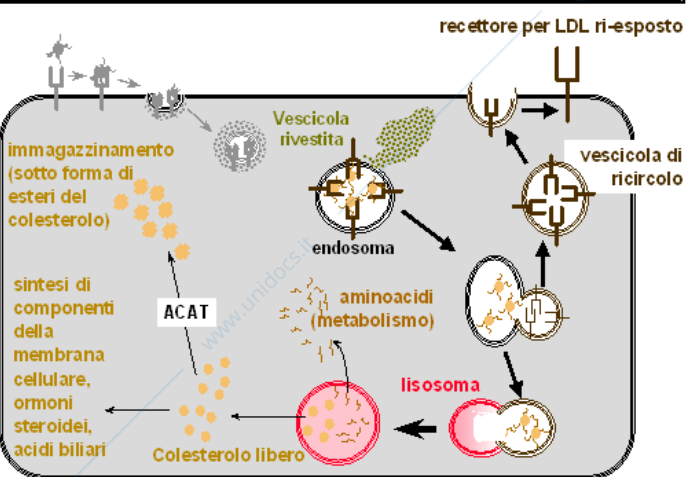
Ogni cellula è capace di sintetizzare colesterolo. Se però la cellula ha immagazzinato già abbastanza colesterolo la sintesi viene inibita. Se non c'è il recettore il colesterolo rimane in circolo, la cellula che necessita di colesterolo riattiva l'enzima per produrlo da sé.

Nel caso di questa patologia di tipo genetico è alterato il gene che codifica per il recettore dell'Apo B-100, la proteina transmembrana con

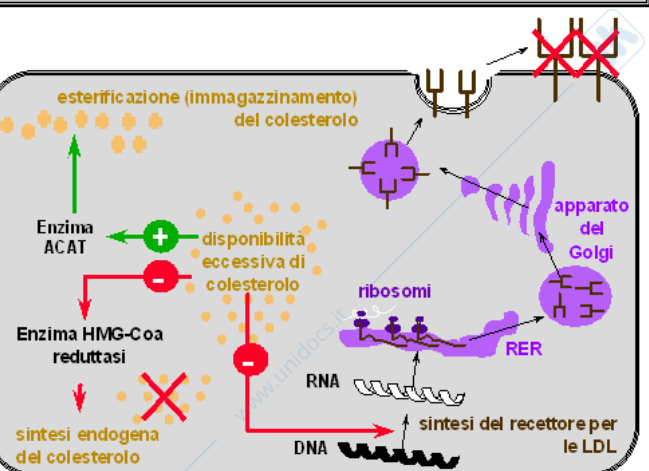
TRASPORTO E METABOLISMO INTRACELLULARE DEL COLESTEROLO



TRASPORTO E METABOLISMO INTRACELLULARE DEL COLESTEROLO



TRASPORTO E METABOLISMO INTRACELLULARE DEL COLESTEROLO



parecchi domini tra cui il recettore lipo-terminale che lega LDL.

Se il recettore è geneticamente alterato, non c'è recettore o non funziona in queste cellule la sintesi di colesterolo non viene inibita. Ciò comporta che la persona ha sia i lipidi portati con la dieta che quelli sintetizzati, perciò si usano le statine come farmaco che intervengono nella sintesi endogena di colesterolo.

Il recettore mutato determina la FH (*Familiar Hypercholesterolemia*) per cui abbiamo inserzioni nei diversi esoni, delezioni, mutazioni non-sense, missense o splicing alternativo errato.

Una mutazione può portare a:

- Un recettore negativo, ovvero un codone di stop che non permette di tradurre il recettore.
- Codoni negativi che impediscono la maturazione del prodotto genico e il trasporto del recettore in membrana esterna.
- Un recettore deficiente per cui le mutazioni formano il recettore, ma questo non lega bene le LDL, 1-10% del recettore normale.
- Un'internalizzazione deficiente, ovvero quando il recettore è presente ma la vescicola di clatrina non viene internalizzata.

Le persone con questo difetto hanno insorgenza molto precoce di arterio- e coronarosclerosi (bambini con 200 e più di colesterolo). Il deposito di colesterolo a livello della valvola aortica può provocare una stenosi aortica sintomatica.

I livelli di colesterolo sono elevati e i pazienti omozigoti non riconosciuti adeguatamente muoiono precocemente, entro i vent'anni, per le complicanze dell'infarto. I pazienti eterozigoti possono incorrere in infarto miocardico già verso i trent'anni con picco d'incidenza tra la quarta e la quinta decade di vita. Le lesioni per ipercolesterolemia sono le stesse in un paziente di 20 e di 60 anni, l'unica differenza è il momento della vita in cui si presenta la patologia.

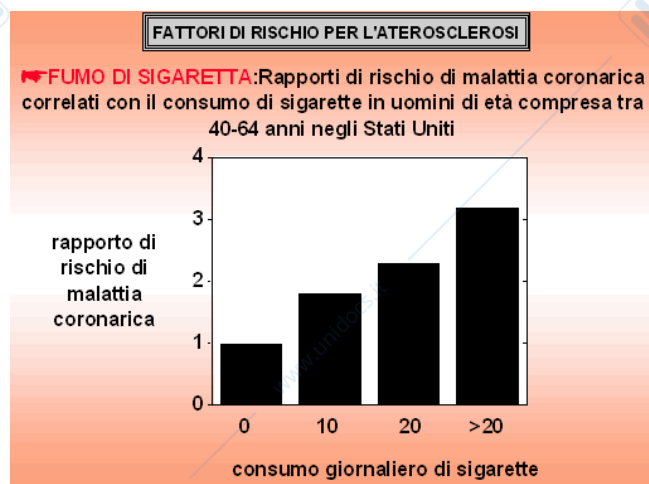
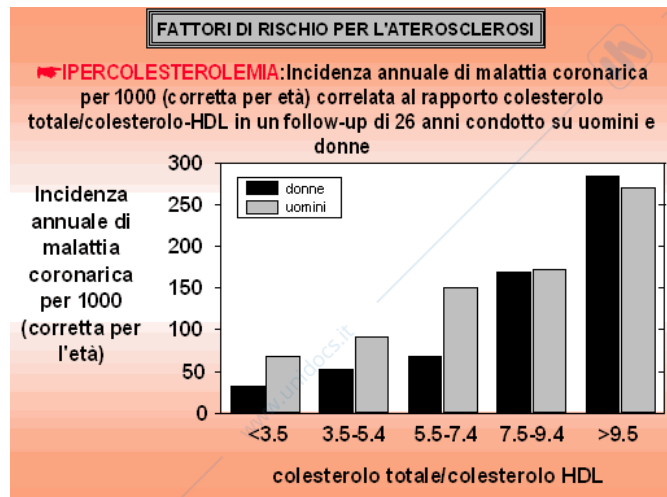
Nel 2-5% dei pazienti diagnosticati FH si è scoperto che hanno invece una mutazione di Apo-B 100 (FDB), non del suo recettore.

Si parla quindi di un'altra patologia autosomica dominante, il risultato è lo stesso ma questi pazienti hanno mutazioni nel gene che codifica Apo B-100. La proteina viene normalmente tradotta ed assemblata nelle LDL, ma queste risultano avere una affinità marcatamente ridotta per il recettore delle LDL sugli epatociti. Il legame recettore-proteina non avviene. La manifestazione è la stessa per FH e FDB:

c'è un eccesso di colesterolo nel sangue che non viene captato.

Le HDL contengono prevalentemente colesterolo, hanno il compito di trasportare il colesterolo dai tessuti al fegato (processo detto trasporto inverso), ma hanno anche un effetto protettivo sulla malattia coronarica. Si è visto che le persone con meno di 35mg/dL di HDL hanno una malattia coronarica nel 58% dei casi (I livelli di HDL normali sono sopra i 50mg/dL). Più basso è HDL, e quindi più si abbassa il rapporto HDL/LDL, più diminuisce l'incidenza di malattia coronarica nel paziente. Più sono basse le HDL, più basse sono le probabilità di avere malattie coronariche.

Le apolipoproteine cruciali per le HDL sono le ApoA-1 perché costituiscono il loro recettore.



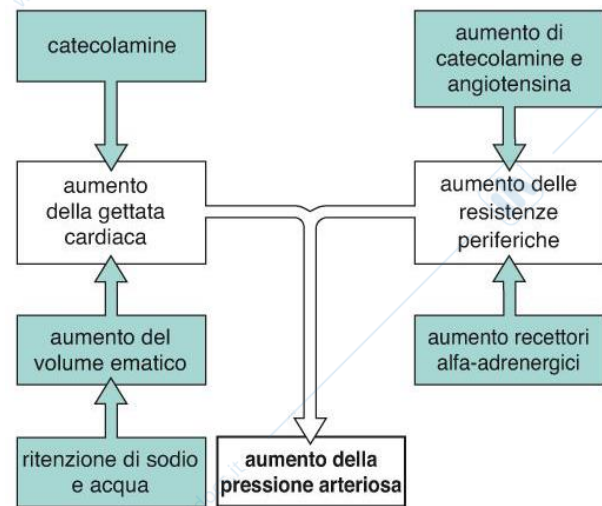
Un altro fattore di rischio legato all'arteriosclerosi è il fumo: oltre le 20 sigarette al giorno, il rischio di morte per infarto aumenta dal 70 al 200%. L'ipertensione sopra i 95-165 di pressione sistolica e pressione diastolica aumenta il rischio di infarto del miocardio di circa 5 volte rispetto a pazienti con una pressione normale.

La pressione arteriosa è la forza esercitata dal sangue sulle pareti dei vasi arteriosi. Il cuore batte intorno alle 70-80 volte al minuto: 0,1 secondi di sistole atriale, 0,3 secondi di sistole ventricolare e 0,4 di diastole (fase di rilassamento). La pressione viene definita massima durante la sistole in cui il sangue viene espulso dal cuore, mentre la pressione diastolica in fase di rilassamento della muscolatura cardiaca è detta minima.

Una delle variabili che intervengono nella pressione arteriosa è la gittata cardiaca, ovvero il sangue espulso dal cuore in un minuto che è di circa 5,5 litri al minuto. Anche i livelli di vasocostrizione in periferia modulano la pressione ematica: le resistenze sono date dallo spessore dei vasi arteriosi e quindi dal diametro del lume delle arteriole. Quindi qualunque fattore che fa aumentare la gittata cardiaca o la resistenza periferica rappresenta un potenziale fattore di rischio per l'arteriosclerosi. In condizioni normali, la regolazione porta ad una pressione normale di 120-170 mg/mm.

La gittata cardiaca dipende da:

- Volemia, ovvero il volume di sangue pompato dal cuore. La volemia è regolata soprattutto dal rene che riassorbe più o meno acqua e sodio, per questo ai pazienti affetti da ipertensione si consiglia una dieta a basso contenuto di sodio e si prescrivono farmaci diuretici;
- Ritorno venoso, quanto sangue rientra dalla periferia;
- Frequenza del battito, circa 70 battiti/minuto. La frequenza varia durante l'esercizio fisico, con la paura e lo stress per azione delle catecolamine;
- Contrattilità del cuore;
- Dimensioni del ventricolo stesso.



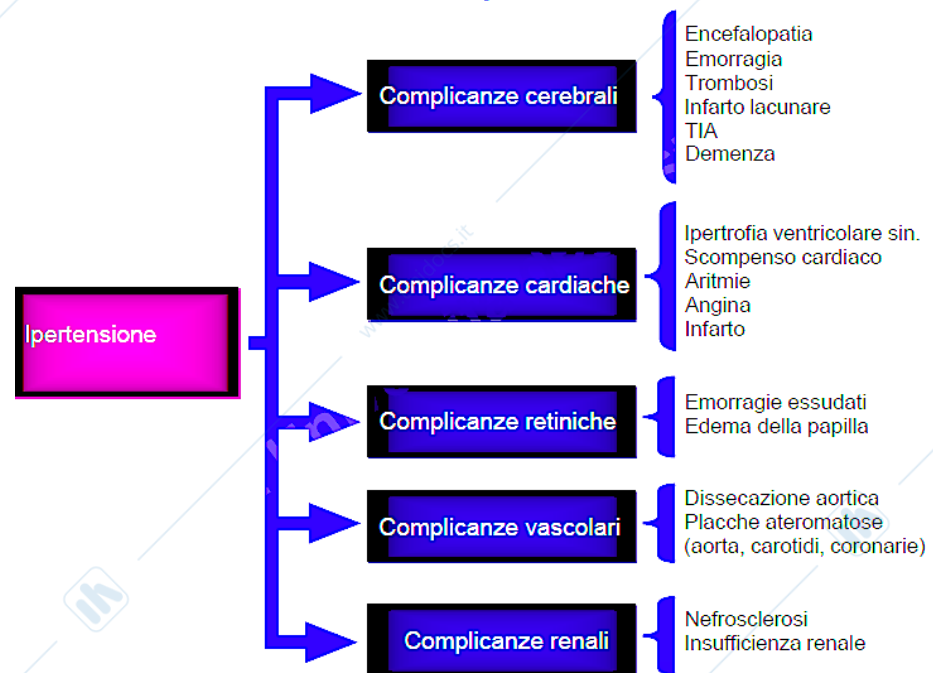
La resistenza periferica invece è influenzata da:

- Innervazione simpatica e parasimpatica;
- Presenza di fattori vasocostrittori come le endoteline, peptidi ad attività vascostrittrice, e l'angiotensina.
- Presenza di fattori vasodilatatori, come l'ossido di azoto(NO).
- Aumento di recettori α -adrenergici, di angiotensina e catecolamine.

Il sistema di regolazione dell'angiotensina ha inizio con la sintesi di angiotensina I grazie a renina e angiotensinogeno che si trovano a livello renale. L'angiotensina I viene trasformata con l'enzima ACE (*angiotensin converting enzyme*) in angiotensina II, un mediatore che causa vaso costrizione e stimola il rene a produrre aldosterone per riassorbire acqua e sodio a livello renale (ritenzione idrosalina). Nella terapia farmacologica si prescrivono gli inibitori di ACE. La maggior parte delle ipertensioni descritte nella popolazione sono idiopatiche, ovvero non si sa quali siano i motivi che le causano, non ci sono cause apparenti o primitive.

L'**ipertensione arteriosa** è una malattia comune caratterizzata da un aumento stabile dei valori della pressione arteriosa, oltre un valore soglia definito sulla base delle evidenze epidemiologiche. Colpisce il 20% degli adulti e il 50% degli ultra 60enni ma solitamente si

manifesta dopo i 40 anni. In Italia, colpisce il 33% degli uomini e il 31% delle donne. E' dovuto all'aumento della pressione arteriosa con l'età, ma è anche frutto di fattori genetici, attività fisica, consumo di alcol e obesità. Il vero problema dell'ipertensione è che non dà sintomi, spesso passa indagnosticata, inoltre una elevata percentuale di popolazione non si cura. L'ipertensione ha base genetica perché almeno 20 geni sono addetti alla sua regolazione. Dipende sia da geni che regolano il normale riassorbimento di acqua e sodio, modulando la volemia, sia da geni coinvolti nel controllo del calibro vasale che quindi possono aumentare le resistenze periferiche. Alcuni dei sintomi dell'ipertensione sono la cefalea (mal di testa al mattino che migliora quando si sta seduti), le vertigini, i ronzii auricolari, ansietà, epistassi e dispnea da sforzo. L'ipertensione grave in poche settimane può causare cecità, emorragia cerebrale e insufficienza renale. Questo processo è lento e da un punto di vista cardiovascolare, l'ipertensione cronica che non viene curata aumenta l'ispessimento delle pareti vasali per risposta al danno pressorio, predisponendo alla formazione di placche arteriosclerotiche. Ne deriva inoltre un rischio di compromissione dell'attività renale come la nefrosclerosi che porta ad insufficienza renale cronica.



PATOLOGIE GASTRICHE

La patologia gastrica è estremamente frequente e, se non curata, anche molto pericolosa. L'incidenza della malattia è alta: circa il 10% della popolazione dei paesi industrializzati viene colpito in qualche momento della vita.

Ulcera peptica è un gruppo di malattie ulcerative del duodeno e dello stomaco, che hanno in comune la patogenesi; la patogenesi è caratterizzata dalla presenza di acido ed enzimi in grado di digerire la parete gastrointestinale (pepsine).

La patologia è legata ad un'alterazione dell'equilibrio tra fattori aggressivi (acido e pepsina) e fattori protettivi (resistenza della mucosa).

Questa patologia ha avuto una svolta decisiva nella sua interpretazione e nella terapia grazie alla scoperta di un batterio: *helicobacter pylori*, in grado di colonizzare la mucosa gastrica e in grado di creare lo squilibrio tra i fattori.

Struttura dello stomaco

Organo cavo costituito da una parete muscolare e rivestito da una mucosa che si solleva a pieghe. È sostanzialmente una sacca che ha alcuni ingressi diretti: in alto c'è l'entrata dell'esofago, che si innesta nella zona dello stomaco detto cardias; questo sporge verso alto con una zona detta fondo, anche se in realtà è la parte più apicale.

Abbiamo poi il corpo, in cui vediamo la piccola e la grande curvatura, e poi zona di passaggio al primo tratto dell'intestino (duodeno), che viene chiamata antro pilorico, dove abbiamo la valvola pilorica, che permette il passaggio del chimo digerito all'intestino.

La mucosa si solleva in pieghe ed è costituita da diversi *elementi ghiandolari*, importanti nei meccanismi di tipo digestivo e protettivo della struttura.

Le ghiandole hanno un lungo colletto, dove si affacciano ghiandole caliciformi mucipare, in grado di secernere muco e bicarbonato nel lume intestinale per rivestire struttura della mucosa stessa.

La mucosa è formata da *cellule parietali* (secernono HCl) e *principali* (secernono enzimi: pepsinogeno); il pepsinogeno viene secreto in forma inattiva e diventa attivo (pepsina) solo quando arriva in un ambiente fortemente acido, quindi il processo digestivo è portato avanti da entrambi i tipi cellulari.

I meccanismi di regolazione della secrezione di HCl e pepsinogeno è altamente regolata da cellule presenti nella mucosa dello stomaco stesso: cellule G (secernono gastrina, stimolatore della secrezione) e cellule D (secernono somatostatina, ormone inibitorio) e cellule istaminergiche presenti nella parete dello stomaco; le cellule istaminergiche sono le cellule su cui sono stati diretti i meccanismi di protezione e di terapia dell'ulcera gastrica.

La presenza di acido è la caratteristica del succo gastrico. HCl secreto dalle cellule parietali crea un gradiente di acidità 10000 volte superiore a quello presente nell'organismo.

Nello stomaco è presente una *pompa protonica*: meccanismo di scambio tra H^+ e K^+ ; presenza di un eccesso di ioni H^+ nel lume intestinale determina patogenicità.

La pompa è il secondo bersaglio farmacologico (quello più nuovo) per il trattamento di ulcera. La digestione inizia quando il soggetto vede, sente odore, gusto o pensiero del cibo; questo è un meccanismo psicologico importante, veicolato dal snc tramite il *sistema colinergico vagale* (nervo vago innerva abbondantemente lo stomaco).

Questo meccanismo vagale, prima dell'introduzione del cibo, è importante perché è stato per molto tempo il meccanismo su cui agivano i chirurghi per ridurre la secrezione acida, quando non avevamo ancora i farmaci.

La fase più importante del meccanismo digestivo è la fase gastrica, quando il cibo arriva a livello dello stomaco. La parete dello stomaco si dilata (riflesso muscolare), dando inizio alla fase

digestiva, con produzione di derivati, soprattutto amminoacidici, che vanno a stimolare le cellule G.

La gastrina secreta dall'intestino necessita di secrezione circolatoria e, tramite questa, la gastrina arriva alle cellule principali (gastrina è il più potente stimolatore di motilità e secrezione).

La terza fase digestiva preclude una riduzione della secrezione acida gastrica ed inizia quando il chimo arriva a livello duodenale; le cellule duodenali sentono acidità e secernono secretina, colecistochinina e GIP (riduce contrattilità stomaco).

Cellule sulle mucosa: cellule in grado di secernere gastrina e Ach, a seguito di stimolazione vagale; sono stimoli positivi, che fanno aumentare il calcio e attivano la pompa protonica.

L'attivazione di questa pompa però, avviene in presenza di un'elevata quantità di adenilato ciclasi, attivata da istamina.

I recettori di istamina sono definiti H₂, specifici della parete gastrica. Dato che sono recettori specifici, abbiamo potuto produrre bloccanti specifici (cimetidina, ranitidina), che inibendo adenilato ciclasi, inibiscono il funzionamento della pompa protonica.

Attualmente, la terapia per ulcera è basata su bloccanti della pompa protonica (omeprazolo), che bloccano scambio H⁺ e K⁺ riducendo acidità e hanno potenza maggiore degli anti-H₂.

Effetti collaterali omeprazolo e derivati: usati per molto tempo causano danni a livello coronarico.

Secrezione di pepsinogeno

In realtà ci sono 7 diverse pepsine, che derivano da 7 diversi pepsinogeni, che però hanno caratteristiche simili, per quanto riguarda il meccanismo metabolico e la necessità di essere attivate di pH estremamente acido.

Ulcera peptica

All'inizio la cura era prevalentemente dietetica (dieta molto stretta).

Possono stimolare secrezione acida gastrica: caffè normale o decaffeinato, birra e vino (tramite ammine o prodotti della fermentazione), calcio per os (calcio usato come supplemento nella terapia per osteoporosi nei pazienti anziani).

Meccanismi protettivi anti-ulcera

- ✓ Muco: la difesa è data soprattutto dallo strato di muco prodotto dalle cellule caliciformi mucipare, che deve essere continuamente prodotto dalle cellule stesse; questo perché il muco contiene mucoproteine che vengono digerite a livello apicale da acido gastrico.
 - Il muco deve isolare l'apice cellulare dal lume intestinale e deve contenere bicarbonato di sodio, contro acidità.
 - Quando questo muco funziona, il pH cellulare si avvicina alla neutralità, se invece è troppo acido lesione.
- ✓ Prostaglandine (soprattutto della serie E, dette housekeeping):
 - Stimolano secrezione muco gastrico
 - Stimolano secrezione di bicarbonato nel muco gastrico
 - Partecipano a mantenere impermeabilità delle barriere della cellula mucosa
 - Favoriscono flusso sanguigno della mucosa: il muco deve essere prodotto in continuazione e per farlo dobbiamo avere flusso sanguigno.
 - Favoriscono il rinnovamento cellulare dopo danno della mucosa.

L'equilibrio tra fattori aggressivi e protettivi è la situazione che deve essere mantenuta per non avere patologia.

Ulcera duodenale e ulcera gastrica, che producono entrambe lesione della parete dello stomaco o duodeno, sono però legate ad un meccanismo diverso:

- Ulcera duodenale: aumentano fattori aggressivi, mentre quelli protettivi sono normali ma non più sufficienti a proteggere.
- Ulcera gastrica: diminuzione fattori protettivi.

Helicobacter pylori

Bacillo microaerofilo (sopravvive bene a basse tensioni di O₂), flagellato (per aderire alla superficie cellulare), gram -.

È presente nel 95-100% dei pazienti con ulcera duodenale e 75-85% dei pazienti con ulcera gastrica, ma anche nel 30-60% di soggetti sani; questo vuol dire che *Helicobacter pylori* va considerato fattore co-patogenetico e non fattore patogenetico. Nonostante ciò, alla base della terapia dell'ulcera, l'eliminazione di *Helicobacter pylori* facilita la guarigione.

È stato scoperto nel 2002-2003 da Marshall e Warren.

Helicobacter è diffuso nell'ambiente e viene trasmesso tramite meccanismo orale-orale, orale-fecale; il numero dei soggetti infestati è direttamente proporzionale alle condizioni igieniche-ambientali in cui vivono.

Helicobacter si localizza negli strati profondi del muco e tra muco e cellule epiteliali gastriche, ma non invade la mucosa (quindi non si può parlare di infezione). In questa posizione l'acidità gastrica non arriva, quindi è relativamente protetto da questa posizione, che gli permette di aderire all'apice cellulare tramite le fimbrie; la sua forma spiralata e la presenza di flagelli lo rendono mobile nello strato mucoso.

Causa sempre una gastrite cronica.

La patogenicità di *Helicobacter pylori* è legata alla sua capacità di produrre diverse proteine, che causano o facilitano l'instaurarsi di lesioni alla mucosa gastrica. Inizialmente colonizza l'antro, per poi diffondersi a tutto lo stomaco.

Primo meccanismo identificato tra i lesivi è la presenza di un enzima: ureasi, in grado di trasformare urea in ammoniaca; ammoniaca, in ambiente acquoso, → NH₄⁺ e OH⁻. Questa reazione protegge *Helicobacter* dall'acidità gastrica, mentre la produzione di OH⁻ è il primo evento lesivo.

Identificazione *Helicobacter*

- Esame istologico
- Coltura batterica
- Test dell'urea: misura aumento di pH prodotto da idrolisi di urea ad opera di ureasi; l'aumento di pH fa virare un indicatore oppure si usa urea marcata, che poi produce CO₂ marcata.

Molto importante in identificazione di ulcere è la gastroscopia, tramite cui possiamo verificare presenza di ulcera o inizio di tumore gastrico, che si manifesta allo stesso modo.

Oltre a OH⁻, il batterio produce proteine, che sono in grado di provocare molti danni alla mucosa gastrica.

Solitamente i fattori che vengono definiti di virulenza sono codificati da un tratto di DNA definito *cag-Pai*. In questo tratto vengono sintetizzate proteine (citochine infiammatorie), che intervengono nell'adesione alla mucosa e sono deputate nel controllo della proliferazione cellulare e apoptosi. Se si alterano questi meccanismi di proliferazione e apoptosi possiamo avere situazioni in cui il tumore gastrico è stimolato nel suo sviluppo.

Elemento più importante di *cag-Pai* è *cagA*, che viene iniettata nelle cellule della mucosa, dove altera i complessi giunzionali, attiva produzione di citochine pro-infiammatorie, e attiva via di trasduzione del segnale legata a RAS-chinasi.

Un altro gene batterico, che non è localizzato in *cag-Pai*, ma che è associato allo sviluppo di patologia è *vacA*. Questo gene codifica per la proteina VacA dotata di capacità di:

- Indurre vacuolizzazione delle cellule.

La citotossina VacA va anche nei mitocondri, dove:

- Innesca rilascio di citocromoC, essenziale per apoptosi.

- Induce produzione di citochine pro-infiammatorie.
- Agisce da regolatore della risposta immunitaria cellulare (azione immunosoppressiva nell'inibizione dell'attivazione e proliferazione dei linfociti).

Diversi ceppi di *Helicobacter pylori* sono in grado di esprimere diversi livelli di questi fattori, per questo abbiamo spettro di lesioni che va dal nulla, fino al tumore gastrico.

Trattamenti approvati da FDA per *Helicobacter pylori*

Helicobacter è sensibile ad antibiotici, anche se stanno comparando ceppi resistenti.

L'eliminazione prevede un uso prolungato e intensivo di antibiotici (per posizione molto protetta)

Omeprazolo e caritomicina; bismuto subsalicilato (poco costoso).

Terapia di farmaci si associa sempre con antiacido per ridurre secrezione acida gastrica.

Per guarire ulcera va bene anche solo antiacido, ma la terapia antibiotica è importante per impedire le recidive.

Sappiamo che *Helicobacter* è presente in quasi tutte le ulcere gastriche e meno nelle duodenali e questo perché le adesine di *Helicobacter* sono specificamente efficaci sulle cellule della mucosa gastrica e non duodenale.

Le cellule della mucosa duodenale di soggetti con infezione da *Helicobacter*, producono meno bicarbonato in risposta all'acidificazione duodenale. L'acidificazione duodenale può produrre metaplasia gastrica e successiva colonizzazione con *Helicobacter* (quindi colonizzazione avviene in un secondo tempo).

Ulcera duodenale

Fra le due patologie è quella più frequente.

È una patologia cronica ricorrente: importanti fasi di attivazione e altre di remissione.

Si producono ulcerazioni profonde, ovvero lesioni della mucosa, che penetrano nella sottomucosa, fino a livello della struttura muscolare (che in casi di complicazioni può anche essere perforata).

Nella maggior parte dei casi le lesioni si trovano entro 3cm dalla valvola pilorica, perché abbiamo detto che ulcera duodenale è legata ad eccessiva produzione di fattori acidi (chimo acido proveniente da stomaco).

Ha frequenza è analoga nei due sessi.

È una situazione che di solito si verifica nel giovane adulto (mentre gastrica nell'anziano).

Abbiamo detto che ci sono fasi di attivazione e altre di ricaduta: circa 80-90% dei pazienti, anche se guarisce spontaneamente dall'ulcera, ha una ricaduta entro 2 anni.

Possono partecipare alla patogenesi:

- Fattori genetici: gruppo 0 e lo stato di non secretore (assenza di secrezione degli antigeni eritrocitari AB nel succo gastrico).
- Fumo: riduce secrezione di bicarbonato pancreatico.
- Fattori psicologici: attualmente ritenuti molto meno importanti di un tempo.
- Uso di FANS: inibendo secrezione di prostaglandine facilitano insorgere di ulcera gastrica, sbilanciando equilibrio tra fattori aggressivi e protettivi.
I FANS in pochi giorni e in qualsiasi individuo provocano ulcera.
- Situazioni patologiche: insufficienza renale cronica, cirrosi alcolica, trapianti di rene, iperparatiroidismo, bronco-pneumopatie.

Sintomatologia

Dolore epigastrico (acuto, urente) 1.5-3 ore dopo i pasti.

Il dolore viene attenuato da cibo (tampona acidità che si è creata), latte (per stesso motivo di cibo) e da antiacidi.

La sintomatologia è di solito ricorrente con episodi della durata da giorni a mesi ed è spesso presente un aggravamento al cambio stagionale.

L'ulcera può essere asintomatica.

L'insorgere di sintomatologia dispeptica (nausea, vomito) in un ulceroso duodenale può essere un segnale dello sviluppo di complicazione.

Complicazioni

- Emorragia
- Perforazione di pancreas e cavità peritoneale
- Stenosi pilorica con impedito svotamento gastrico: nausea, vomito.

Ulcera gastrica

La massima incidenza si verifica nel soggetto anziano, quindi 10 anni dopo il picco di incidenza dell'ulcera duodenale.

Quasi tutte le ulcere si verificano subito distalmente al punto di unione tra antro e corpo dello stomaco, in particolare sulla piccola curvatura. Sono quasi tutte sempre accompagnate da gastrite antrale con atrofia mucosa di varia entità.

La sintomatologia può essere simile a quella duodenale, ma solitamente il dolore da acidità è meno importante, non associato direttamente ai pasti e risponde peggio a somministrazione di antiacidi.

Complicazioni

- Emorragia
- Perforazione
- Ulcere cancerose: adenocarcinoma si può presentare sotto forma di ulcera gastrica e la gastrite atrofica è un elemento patogenico comune (1-8% di casi vi è associazione comune delle due patologie).

Ulcere da FANS

Una consistente percentuale di pazienti (4-50%) che usano FANS in modo continuato, sviluppano una lesione alla mucosa gastrointestinale.

Le lesioni sono principalmente presenti a livello gastrico, ma anche duodenale.

Si riconoscono diverse tipi di lesioni da FANS:

- Erosioni superficiali che coinvolgono solo mucosa (gastriti).
- Ulcere endoscopiche: non associate a sintomatologia o significative complicazioni, ma possono dare origine a emorragie, perforazione, ostruzione pilorica.
- Ulcere cliniche: indistinguibili da alti tipi di ulcera.

La lesione è dovuta all'incapacità dei FANS di impedire sintesi di ciclo-ossigenasi, che blocca meccanismo infiammatori e citochine.

Sono stati creati farmaci contro ciclo-ossigenasi di tipo 2, però ciclo-ossigenasi 2 è endoteliale, mentre ciclo-ossigenasi di tipo 1 è piastrinica; quando diamo inibitore tipo aspirina le blocchiamo entrambe, quindi blocchiamo sia trombossano che prostaciclina (blocchiamo meccanismo sia pro sia contro trombotico).

Quando blocchiamo ciclo-ossigenasi 2 blocchiamo solo la prostaciclina, quindi meccanismo anti-trombotico. I farmaci contro la ciclo-ossigenasi 2 sono stati ritirati perché aumentavano danni al miocardio.

Altri tipi di ulcere

Sindrome di Zollinger-Ellison: legate a tumori che secernono elementi come gastrina; iper secrezione di gastrina, che stimola la secrezione acida gastrica, può produrre iper secrezione di HCl e quindi ulcera.

Bisogna eliminare tumore (a livello pancreatico di solito si riesce).

Ulcere da stress (grave stress di tipo fisico): sono ulcere che vanno da erosione a vere e proprie ulcere.

Sono causate da shock, traumi, sepsi, traumi cranici o aumento della pressione intracranica. Sono situazioni in cui l'organismo produce ischemia della mucosa, perché cerca di dirottare il sangue dove abbiamo lesione; una ridotta perfusione gastrointestinale impedisce sintesi di bicarbonato e quindi ulcera.

Gastrite acuta

È un'inflammazione della mucosa gastrica, che presenta differenti caratteristiche cliniche, istologiche ed eziopatologiche.

È una lesione più estesa ma più superficiale (mucosa), ma la situazione può essere così estesa da causare emorragia (gastrite acuta erosiva emorragica). L'emorragia è di vasi che vascolarizzano zone superficiali della mucosa e non di grandi vasi.

La gastrite acuta può svilupparsi senza apparente motivo, ma più spesso si associa a stress fisico, assunzione di farmaci (FANS e corticosteroidi), alcol.

La gastrite acuta può anche essere prodotta da agenti infettivi, soprattutto da *Helicobacter pylori*, e molto raramente da altri agenti infettivi (batteri, virus, funghi). *Helicobacter* produce sempre gastrite quando si instaura, ma raramente di così grandi dimensioni da causare gastrite acuta.

L'entità della sintomatologia clinica è molto variabile: anche in assenza di dolore può esserci sanguinamento. La perdita di sangue può variare da una emorragia massiccia a presenza di sangue nelle feci.

Gastrite cronica

È estremamente comune: coinvolge il 50% della popolazione con più di 50 anni.

È caratterizzata da:

- Atrofia della mucosa
- Riduzione delle cellule parietali con conseguente ipo- o a-cloridia: il soggetto digerisce male, poco, ha spesso nausea/vomito. Situazione predispone a ulcera gastrica e carcinoma.

Sono patologie spesso asintomatiche.

Gastrite cronica A: autoimmune. I soggetti nel 90% dei casi hanno anticorpi contro cellule parietali e anti-fattore intrinseco, e non saranno più in grado di assorbire vitamina B12.

Solitamente è localizzata a livello del corpo dello stomaco, ma si può estendere a tutto l'organo.

È la patologia meno frequente.

Gastrite cronica B: localizzazione antrale perché è la localizzazione di *Helicobacter*, ma dopo anni coinvolge tutto lo stomaco.

Eradicazione del batterio determina risoluzione di alterazioni istologiche.

Adenocarcinoma dello stomaco

Uno dei tumori più aggressivi e meno curabili.

La sua incidenza sta diminuendo nei paesi occidentali industrializzati per una migliore alimentazione, ma costituisce ancora la seconda causa di morte per tumore.

Se riconosciuto molto precocemente è curabile, ma una volta che ha metastatizzato (superando parete stomaco) non risponde ai chemioterapici.

L'incidenza aumenta per fattori di tipo dietetico (nitrosamine, ipo/a-cloridia), ingestione di cibi affumicati e salati, mancanza di antiossidanti.

Sono tutti sintomi aspecifici e tardivi, per cui la diagnosi precoce è difficile. Segni e sintomi:

- ✓ Dolore epigastrico
- ✓ Anoressia
- ✓ Nausea e vomito
- ✓ Perdita di peso
- ✓ Sangue nelle feci

La sopravvivenza a 5 anni è del 90-95% se l'identificazione è precoce, meno del 20% se il tumore ha già metastatizzato.

Linfoma dello stomaco

Costituisce il 5% di tutte le neoplasie maligne dello stomaco.

Origina dal tessuto linfatico.

Sono patologie non particolarmente aggressive e piuttosto rare rispetto al carcinoma.

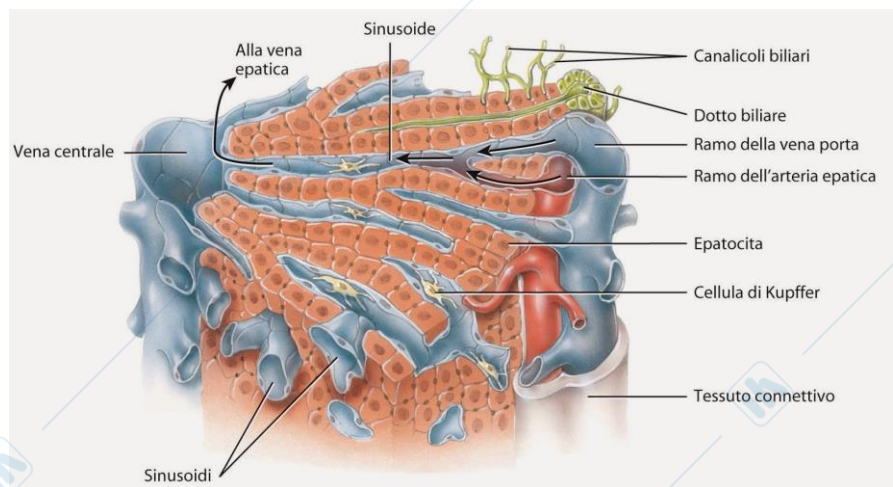
28/04/2016

PATOLOGIE EPATICHE

Questo tipo di patologie si basa su infiammazioni acute che si trasformano in epatopatie croniche come la cirrosi epatica. Il fegato è la più grossa ghiandola dell'organismo umano formato da un insieme di lobuli esagonali evidenziabili funzionalmente più che fisicamente perché i lobuli non sono divisi tra loro ma sono tutti posti attorno alla vena centro-globulare.

Le triadi portali sono costituite dal sangue proveniente da:

- Vena porta, sangue venoso che proviene dall'intestino e veicola tutte le sostanze assorbite a livello gastro-intestinale;
- Arteria epatica, fornisce ossigeno;
- Canalicolo biliare, porta la bile all'intestino.



Il sangue venoso e arterioso

si mischiano fino ad arrivare alla vena porta. I sinusoidi epatici costituiscono il secondo plesso capillare del sistema portale epatico, il plesso di origine sono i capillari presenti nella area splenica fino i capillari epatici. Il flusso è lento, ha una bassa pressione.

Il fegato ha una struttura sinusoidale dove avviene lo scambio tra sangue ed epatociti. Tra il sinusoidale e gli epatociti si trovano gli *spazi di Disse*: zone dove si raccoglie il plasma per favorire gli scambi. Qui si trovano anche le *cellule di Ito* che sono addette al metabolismo della vitamina A, queste cellule entrano in azione nei meccanismi infiammatori producendo collagene. Sono uno dei meccanismi che impediscono gli scambi tra epatociti e sangue.

Nei sinusoidi si trovano le *cellule di Kupffer*, adese al vaso e molto importanti nella clearance del sangue, che hanno funzione fagocitaria per pulire da globuli rossi vecchi, complessi antigene-anticorpo, etc.

Gli epatociti sono uniti tra loro da delle macule dense, delle zone occludenti che danno inizio ai canalicoli biliari. Non sono dei veri e propri canali, non hanno una parete propria ma qui viene secreta la bile dagli epatociti. Sono strutture delicate, infatti nelle infiammazioni epatiche sono le prime strutture ad essere compromesse. La cellula si rigonfia e non abbiamo più la secrezione di bile. I canalicoli sono formati da introflessioni della membrana plasmatica di due cellule adiacenti, chiamate docce. In queste docce sono contenuti i meccanismi con cui il fegato produce la bile: ci sono trasportatori ATP-dipendenti che secernono bilirubina coniugata, acidi e sali biliari, colesterolo, fosfolipidi e pompe sodio-potassio.

I principali trasportatori scoperti sono quelli per colesterolo, fosfolipidi e sali biliari. I trasportatori sono in grado di immettere queste sostanze nei canalicoli biliari grazie ad un sistema recettoriale che valuta se bisogna produrre il flusso biliare dove si formeranno micelle (vescicole). Se vi è iperattività dei trasportatori si formano dei calcoli biliari perché non vi è una sufficiente solubilizzazione.

Il lobulo epatico normale è privo di connettivo, ci sono strutture connettivali solo negli spazi portali. Durante l'epatite cronica abbiamo invasione di connettivo proprio in queste zone.

Il fegato è importante nel metabolismo gluconeogenetico mantenendo la glicemia nei periodi intra-prandiali, per la sintesi dei corpi chetonici e di lipoproteine (VLDL, trasportano trigliceridi sintetizzati a livello epatico) ed è anche un'importante fonte di energia.

Ha importanza nella formazione delle LDL prodotte dal fegato che trasportano i trigliceridi inutilizzati a livello epatico e captati dalla circolazione. Questo ruolo è determinante nel trasporto del colesterolo e nella sua eliminazione. Il fegato è il principale meccanismo con cui il colesterolo viene eliminato sia tramite la bile, sia con la sintesi di acidi e sali biliari che hanno il colesterolo come punto di partenza. È importante per la capacità di sintetizzare le proteine plasmatiche circolanti, tranne le immunoglobuline. Il fegato è l'unico organo in grado di sintetizzare l'albumina, le proteine di trasporto, le proteine di fase acuta e il complemento (ruolo immunologico). Il fegato è importante nei meccanismi di mantenimento di equilibrio di liquido interstiziale e plasma. La produzione di edemi è un sintomo di carenza epatica.

Il fegato metabolizza l'urea, l'ammoniaca derivante dagli AA. Quando clinicamente abbiamo un'iperammonemia sia di fronte a un'insufficienza epatica. La insufficiente capacità di eliminare urea è invece la iperazotemia.

Il fegato ha una quantità enorme di enzimi P-450 microsomiali nel REL responsabili della trasformazione di prodotti endogeni ed esogeni, come il primo passo nell'idrolizzazione della vitamina D, l'escrezione di molti farmaci, ormoni e tossine. Può influire anche sulla struttura ossea. I macrofagi epatici sono in grado di eliminare batteri e prodotti di sintesi della bilirubina. Fanno la clearance di prodotti degradativi dal sangue.

Esami di laboratorio: Bilirubina e Ittero

La bilirubina si forma a partire dall'Hb, in seguito al meccanismo di degradazione. La distruzione dei globuli rossi senescenti avviene ad opera dei macrofagi nel fegato, milza e midollo osseo, nonostante ciò il 30% della bilirubina deriva dalla distruzione delle proteine che contengono il gruppo eme (es. enzima P-450 microsomiale della mioglobina).

1. L'enzima eme ossigenasi trasforma il gruppo eme nei suoi substrati ferro e protoporfirina, questa viene trasformata successivamente in biliverdina.
2. L'enzima citosolico biliverdina reductasi trasforma il substrato in bilirubina.

Non è un pigmento solubile quindi la si può trovare nell'organismo in due diversi modi:

1. Lega con l'albumina per permettere il trasporto al fegato, solubilizzando in modo non permanente.
2. Nel fegato viene internalizzata dagli epatociti, dove le TRANSFERASI la legano in modo reversibile per impedirne la ridiffusione all'esterno della cellula e ne facilitano il trasporto al REL, dove viene associata ad acido glucuronico, molto più stabile e solubile (BIL-CONIUGATA). In un paziente in salute non è presente bilirubina-glucuronata perché viene tutta eliminata dal sistema biliare, al contrario, viene messa in circolazione solo in caso di patologie.

Nel caso delle epatiti, le cellule bloccano i canalicoli biliari e la bilirubina viene immessa in circolo dando ITTERO MISTO (bilirubina coniugata per il 50% del totale).

Indici di danno cellulare

La lesione epatocitica, permette il rilascio di enzimi generalmente all'interno del fegato ma che vengono rilasciate in seguito ad un danno: le TRANSFERASI. Sono biomarker specifici anche se non vi è una buona correlazione con il danno epatico, l'iperbilirubinemia è migliore.

La lattico-deidrogenasi (LDH) è aumentata nella necrosi cellulare ed è un biomarker non specifico di tumori epatici primari e metastasi. Non è specifico per la patologia epatica.

Indici di colesterasi

L'ittero ostruttivo è definito colestasi, si ha un'ostruzione dei canalicoli biliari a causa di un

aumento della sintesi enzimatica di:

- **Fosfatasi alcalina:** se non si hanno patologie ossee o se non si è in gravidanza, è indice di malattia epatica.
- **γ -glutamilttransferasi:** è il più sensibile indicatore di colestasi, tuttavia aumenta anche in caso di pancreatiti, malattie cardiache, renali e polmonari oltre che nel diabete e nell'alcolismo.

Indici di gravità

- **Albumina circolante**(tempo di protrombina PT): l'ipoalbuminemia e un PT prolungato sono indici di una grave compromissione funzionale epatica. Nella cirrosi un PT prolungato non viene aggiustato da una somministrazione di vit-K. Quando le transaminasi diminuiscono e aumenta ulteriormente il PT vi è necrosi epatica fulminante.
- **Ammonemia:** l'iperammoniemia è l'incapacità di metabolizzare l'ammoniaca derivante dalla digestione degli aa; questa dovrebbe essere trasformata in urea per poi essere eliminata tramite il rene. (i livelli di azotemia sono invece spesso ridotti).

Indici di immunità

Nelle epatopatie croniche è presente una gammopatia policlonale con IgG aumentate, ciò è dovuto dall'incapacità del fegato cirrotico di eliminare gli anticorpi batterici di provenienza intestinale.

Epatiti

Le epatopatie sono infiammazioni del parenchima epatico, solitamente di tipo virale ma possono essere anche di tipo tossico. Possono presentarsi in forma acuta o in forma cronica. L'epatopatia acuta può diventar epatite cronica, in seguito cirrosi epatica per poi evolvere in tumore epatico. Le epatiti virali sono quelle più frequenti sono date da virus A, virus B, virus C, virus E e virus D, in base all'ordine in cui sono stati scoperti. Sono tutti virus a RNA, tranne B. Altri virus possono coinvolgere il fegato ma danno sempre patologie a carattere sistemico.

Questi virus producono una patologia clinicamente simile nella sintomatologia e negli esami da laboratorio, tuttavia possono essere distinti su base antigenica: sono virus che possono dare infezioni asintomatiche fino ad infezioni rapidamente evolutive. Oltre alla possibilità di ostruzione del parenchima epatico, il virus ha la tendenza a produrre una cronicizzazione della malattia. Il virus C, ad esempio, da epatiti modeste o asintomatiche ma tende ad evolvere a cronicizzazione in cirrosi epatica.

Virus A

Il primo virus scoperto è stato il virus A, un picornavirus che è presente in modo transitorio nel sangue e ha un periodo di incubazione di 15-45 giorni. La caratteristica epidemiologica è che viene escreto in forte quantità nelle feci dell'ultimo periodo di incubazione. Il soggetto è infettivo quando non sa di essere ammalato, non prende precauzioni e quindi il rischio di trasmissione della malattia deriva dalla qualità del sistema fognario.

La trasmissione avviene per via fecale o orale quando il soggetto sano viene a contatto con liquami contenenti virus. Non ci sono portatori sani (a differenza del virus B).

È una patologia che di solito guarisce spontaneamente, soprattutto nei bambini. Si producono rapidamente anticorpi diretti contro antigeni di superficie capsidici del virus A. Nei test di laboratorio si distinguono l'infezione recente da quella avanzata per lo shift di catena. Il virus viene rapidamente inattivato dal calore (1 min in bollitura) e dai disinfettanti (formaldeide, cloro, UV).

Sono le condizioni igieniche-ambientali e alcune abitudini alimentari (molluschi e bivalvi mangiati crudi) a costituire il principale mezzo di trasmissione.

La contrazione della malattia da immunità permanente. Il virus ha escrezione fecale nel periodo precedente all'ittero, in cui il paziente si rende conto della colorazione cutanea e mucosale.

Gli anticorpi anti-HVA presenti nelle frazioni immunoglobuliniche in commercio garantiscono protezione da infezione. Attualmente, abbiamo una vaccinazione che utilizza virus inattivati, ma che è estremamente efficace. Purtroppo è una vaccinazione consigliata, ma non ancora resa obbligatoria. E' consigliata per chi reca in zone endemiche.

L'epatite di tipo A da raramente forme di epatite cronica e/o forme evolutive, non vi è una terapia specifica ma una sintomatica.

Virus B

Il virus B è un hepadnavirus, unico a DNA. Basta una goccia di sangue per trasmettere la malattia. E' presente nel sangue per un periodo prolungato a partire dall'ultimo stadio dell'incubazione(30.180 giorni). Le feci non contengono il virus, esso è presente in tutti gli altri liquidi dell'organismo tra cui il liquido seminale e le secrezioni vaginali.

La trasmissione è sessuale. Vi è anche la possibilità di trasmissione percutanea, ma il contatto con un soggetto ammalato è una via poco efficiente. Durante la gestazione, la madre può trasmettere virus al figlio per via transplacentare: il bimbo con epatite B rischia ad andare incontro a cirrosi epatica molto precoce.

Nel 30% di casi non c'è un anamnesi positiva di trasmissione percutanea chiaramente identificabile. Vi sono circa 350 milioni di portatori sani nel mondo, che costituiscono la riserva della malattia.

Il virus B può essere estremamente aggressivo e inibire il fegato in una settimana oppure essere asintomatico. Sostanzialmente, questa reazione è legata alla capacità immunologica dei diversi soggetti.

L'antigene HBsAg è il primo marker sierologico del virus, sostanzialmente rappresentato da due polipeptidi presenti nei virus. E' la prima ricerca che si fa nel sangue del soggetto sospettato infetto. Si ritrova per tutta la durata della fase itterica e oltre ma poi scompare, perché compare l'anticorpo diretto contro questo antigene. Gli anticorpi anti-HBs sono quelli che curano la malattia.

L'antigene del capsido HBcAg non si trova in circolazione, mentre l'anticorpo anti-HBcAg compare all'inizio o subito prima della fase clinica e permane indefinitamente. Inizialmente gli anticorpi sono IgM e poi IgG; data questa distinzione possiamo datare l'origine della malattia stessa.

Il virus mette in circolazione un antigene HBe che viene sintetizzato dallo stesso gene dell'antigene HBc con inizio di trascrizione diversa. HBeAg è indice che il virus si sta moltiplicando (i virus secernono capsidi solo in moltiplicazione) e indice di infettività della malattia. La sua scomparsa coincide con la comparsa di anti-HBeAg.

La presenza di DNA virale in circolazione ha un significato simile alla presenza di HBeAg perché la presenza di DNA virale indica che virus si sta moltiplicando, quindi è indice della gravità della malattia e di infettività del soggetto. La comparsa di questo antigene è dovuta ad un anticorpo anti-HBe che è un marker della malattia. Nelle epatiti croniche viene usato per distinguere fase di stallo da fase di moltiplicazione-infettività.

Donne positive HBsAg e HBeAg/DNA virale trasmettono meno la malattia al bambino rispetto a quelle positive per HBcAg. Se sappiamo che il neonato nascerà infetto, si provvede con immunizzazione con anti-HBs, vaccinato subito dopo la nascita. Funziona nel 85% dei casi.

Il fatto che il virus B può andare da sintomatico forte ad asintomatico è dovuto al fatto che, essendo un virus, per eliminarlo il nostro organismo deve mettere in atto un meccanismo cellulo-mediato, che distrugge le cellule epatiche; se la distruzione non è eccessiva vi è guarigione (nella maggior parte dei casi).

Epatite B può evolvere a:

- Epatite acuta di gravità variabile: 80-90% dei casi. L'infezione può essere violenta come trascurabile. Nel 90% dei casi abbiamo guarigione, mentre nell'1% epatite fulminante e morte. Nella forma acuta non c'è cura, se non quella sintomatica.

- Portatori sani: 5-10%, che però diminuiscono sempre più con vaccinazione, quindi guarigione.
- Epatite cronica: 4%. Può dare guarigione, oppure cirrosi che può evolvere in carcinoma epatico (molto aggressivo) e morte.

Virus D

Il virus D è un virus incompleto che necessita del virus B(HBV) per potersi moltiplicare, necessita della sua DNA polimerasi. Può essere presente come:

Co-infezione: aumento di epatiti fulminanti, ma buona percentuale di guarigione e rare evoluzioni in cirrosi. Si hanno dei peptidi di superficie specifici.

Superinfezione(infezione di B che avviene dopo un'infezione da D): abbiamo epatiti fulminanti nel 7-10% dei casi, guarigioni blande nel 15% e un'evoluzione cirrotica nel 70% dei soggetti. La trasmissione avviene in modo analogo al virus di tipo B, ovvero per contagio sessuale. La vaccinazione del tipo B blocca anche l'infezione del virus D. La differenza sta nel comportamento e nella possibilità di dare co-infezione o super-infezione.

Virus C

Il virus C è presente in quantità modeste, ciò ha ritardato di molto tempo la sua scoperta. È stata la causa più frequente di infezione via ematica per trasfusioni infette. Gli eventi sierologici che sono capaci di captare il virus sono stati inefficienti perché gli antigeni appaiono tardi nella malattia.

Il virus da una sintomatologia poco apparente (o asintomatica) però è responsabile di meccanismi di cronicizzazione. Gli antigeni di superficie vengono sintetizzati da una zona di DNA detta iper-variabile simile alla sintesi di anticorpi. Il corredo genico di superficie è in continuo cambiamento, questo non permette all'organismo di creare anticorpi efficaci. Per questo non abbiamo ancora un vaccino per questo virus.

La trasmissione di questo virus è ancora poco conosciuta, sappiamo solo che è presente in liquido seminale, urine, feci e secrezioni vaginali. La trasmissione sessuale e transplacentare è rara.

La persistenza è per variabilità della malattia. Date le numerose varianti il virus può sfuggire al controllo immunitario e dare cronicizzazione e può evolvere in cirrosi e carcinoma.

Virus E

L'epatite E coinvolge soprattutto il sud-est asiatico e i paesi africani. È sostanzialmente come il virus A, ovvero ha trasmissione via orale e fecale. Spesso produce itteri con spiccate caratteristiche colecistiche, più grave rispetto ad A. È pericoloso soprattutto per le donne gravide, da insufficienza epatica acuta. La sua aggressività in gravidanza è simile al virus Zika, pericoloso per il feto.

Sintomatologia

Fase prodromica: Le epatiti, qualsiasi sia il loro meccanismo genetico, sono caratterizzate da una fase febbricola (più presente nell'epatite A). Abbiamo sintomi di tipo influenzale e disturbi gastrointestinali ma l'unica specificità che ci può fare sospettare un'epatite è un'alterazione di udito e olfatto. Solo l'epatite B può dare una patologia multisistemica da immunocomplessi (in molti casi è artralgia), ma si presenta in una piccola percentuale dei casi.

Fase itterica: L'epatite viene scoperta nella fase endemica da ittero dovuta ad iperbilirubinemia. Il primo riscontro di epatite è dato da urine scure che contengono grosse quantità di bilirubina coniugata, le feci per contro sono chiare (definite cretacee). Può esserci prurito, ittero, epatomegalia dolorosa e splenomegalia (presente solo nel 10-20% dei casi). È evidente soprattutto a livello della sclera dell'occhio e il frenulo linguale (unici posti dove si evidenzia nei soggetti di pelle scura).

Quando compare l'ittero, la sintomatologia di nausea e vomito tende a scomparire. Il soggetto con epatite agli esami di laboratorio presenterà:

- Iperbilirubinemia di tipo misto
- Transaminasi elevate
- Enzimi che indicano colestasi moderatamente elevati
- Linfociti atipici in circolazione (non sempre)
- Ipoglicemia (possibile)
- Positività per bilirubina e per urobilinogeno

Fase di guarigione. Può essere più o meno prolungata a seconda del tipo di virus: 3-4 mesi per l'epatite C e B, 1-2 nel caso dell'epatite A. Se si va oltre, l'epatite potrebbe esser cronica.

Epatite acuta fulminante

È una complicazione acuta dell'epatite virale, raramente presente nelle forme di tipo A e maggiormente presente in quelle di tipo B, D ed E (soprattutto in gravidanza). L'evoluzione dell'epatite è caratterizzata da necrosi epatica massiva, rapida discesa delle transaminasi e prolungamento del tempo di protrombina.

Epatite cronica

L'evoluzione cronica è caratteristica di alcuni virus, il virus B e quello C. La co-infezione e superinfezione da virus B e D può cronicizzare in forme facilmente evolutive. L'evoluzione cronica di un'epatite virale si verifica quando l'infiammazione e la necrosi continuano per almeno 6 mesi. Nell'epatite cronica attiva l'infiltrato infiammatorio si estende al di fuori dello spazio portale, invade il piatto limitante (strato di epatociti che circola lo spazio portale) e penetra nel parenchima circostante. Abbiamo l'invasione di strutture connettivali del lobulo epatico, sono presenti zone di necrosi in tutto il parenchima.

Ci sono forme tossiche dovute da tossine vegetali come l'amanita falloides. La falloidina è un octapeptide termostabile che non viene distrutta dalla cottura.

L'intossicazione da farmaci non è sempre prevedibile, il fenomeno è raro (0,1% dei pazienti). Un buon numero di agenti chimici e di farmaci può provocare danno epatico per inalazione, ingestione o somministrazione parenterale. L'epatotossicità da farmaci si può suddividere in:

- ✓ Prevedibile: meccanismo tossico diretto e correlato con la dose.
- ✓ Imprevedibile: la reazione non è dose dipendente. Di solito sospendendo il farmaco si risolve.

Cenni di terapia delle epatiti croniche

Nell'epatite B, a fianco all'uso di IFN- α pegilato, sono affiancati analoghi nucleosidici o nucleotidici. Questi sono in grado di produrre effetti uguali/maggiori a IFN, ma sono meno tossici e meglio tollerati.

Cirrosi Epatica

La cirrosi epatica è la via ultima comune di tutte le infiammazioni del parenchima epatico che evolvono in modo cronico. Si ha una diminuzione della funzionalità epatica e un aumento della pressione del sistema portale. Può esser una fibrosi diffusa, che origina negli spazi centrolobulari o nello spazio di Disse e da qui invade il parenchima epatico; oppure circondare noduli rigenerativi formati dalla proliferazione di epatociti che distorcono il letto vascolare e la struttura stessa del lobulo epatico. Nel nodulo manca contatto con i capillari, che permette la normale funzionalità del fegato. Inoltre, il nodulo che si ingrossa aumenta ulteriormente la cirrosi nel nodulo epatico.

Il fegato è in grado di rigenerare le sue cellule morte, finché esiste la struttura di reticolina che permette alla cellule di rigenerarsi. I

La cirrosi può venire classificata in:

- Alcolica, 65% dei casi. A quantità che determina la patologia è soggettiva.
- Post virale (virus B, C, D nel 10-30% dei casi)
- Dovuta a farmaci
- Biliare
- Cardiaca
- Associata a malattie ereditarie e/o metaboliche (sindrome di Wilson, emocromatosi, glicogenosi, morbo di Gaucher).
- Ereditaria
- Idiopatica, molto raro.

La cirrosi è un processo di cicatrizzazione e la quantità di collagene che si forma durante questo processo dipende da soggetto a soggetto. Il sesso femminile è molto più sensibile alla cirrosi alcolica del sesso maschile.

29/04/2016

ALTERAZIONI DELL'EMOSTASI

L'emostasi comprende tutti i meccanismi molecolari e cellulari che limitano la fuoriuscita e le perdite di sangue. Le patologie correlate a questi eventi possono essere:

- Mancanza di emostasi, quindi **emorragie**;
- Eccesso di attività coagulante(cioè emostatica) che porta a **trombosi**.

Tra le cellule coinvolte abbiamo:

- Endoteli, piastrine e muscolatura liscia vasale;
- Fattori della coagulazione(o emostatici): proteine plasmatiche(prodotte per la maggior parte dal fegato) che sono essenziali per la coagulazione ematica e proteine essenziali nella disgregazione del coagulo(fibrinolisi).

Fasi dell'emostasi

L'emostasi primaria consiste nell'attivazione delle piastrine e la formazione del tappo piastrinico nel sito dove si è verificata la lesione endoteliale che può essere una rottura del vaso(perdita di continuità con lesione di tutta la struttura vasale) o una lesione endoteliale dovuta a fattori chimici, fisici o infiammatori(come nell'arteriosclerosi). Il tappo piastrinico si forma nei primi secondi dal danno ed è di fondamentale importanza per impedire la perdita di sangue dai capillari, dalle arteriole e dalle venule. Interviene nei tagli superficiali ad esempio: abbiamo vasocostrizione dei vasi che tentano di impedire la perdita di sangue e subito dopo la formazione del tappo piastrinico.

L'emostasi secondaria avviene a seguito della formazione del tappo piastrinico con l'attivazione delle piastrine e la liberazione di mediatori che attivano la cascata coagulativa fino ad arrivare alla formazione del coagulo. Si forma la fibrina che si organizza e complessa in fibre che formano una "parete" che impedisce la fuoriuscita di sangue. Il sistema fibrinolitico digerisce la fibrina. È importante nei vasi di calibro maggiore.

Piastrine

Le piastrine sono frammenti cellulari derivanti dalla frammentazione dei megacariociti(precursori mieloidi) situati nel midollo. I megacariociti sono cellule enormi, senza nucleo e allo stato terminale. Abbiamo circa 150-250mila piastrine per mm^3 . All'interno contengono granuli di vari tipi che contengono mediatori preformati, i quali vengono rilasciati durante l'aggregazione. La loro emivita è di 9-10 giorni da quando vengono rilasciati dai megacariociti. In tutti i casi in cui abbiamo problemi al midollo(terapia antitumorale, ad esempio) con riduzione del numero di megacariociti assistiamo ad una diminuzione del numero di piastrine che non si replicano autonomamente(dipendono esclusivamente dal precursore).

Adesione e aggregazione piastrinica

Il riconoscimento del danno avviene a livello dell'endoteli. Le piastrine sulla superficie hanno una serie di glicoproteine appartenenti alle integrine, in particolare GpIa/IIa($\alpha_2\beta_1$) e Gp6: formate da due catene, α e β (sono eterodimeri) che permettono di aderire direttamente al collagene della membrana basale. Questa è la modalità di adesione più diretta. Inoltre c'è il fattore di von Willebrand, una proteina molto ampia che polimerizza e lega il collagene e le glicoproteine GpIb/IX presente sulla superficie delle piastrine. Il fattore di von Willebrand fa da ponte per mantenere l'adesione forte tra le piastrine ed il collagene. Perché si possano aggregare è però

necessario che le piastrine siano legate tra loro, non solo al collagene: l'aggregazione piastrinica è facilitata dal fibrinogeno(proteina plasmatica che si trasformerà in fibrina per permettere il coagulo) che lega tra di loro le piastrine attraverso complesso di glicoproteine GpIIb e GpIIIa(sono sempre due integrine).

Le piastrine degranulando liberano i fattori al loro interno:

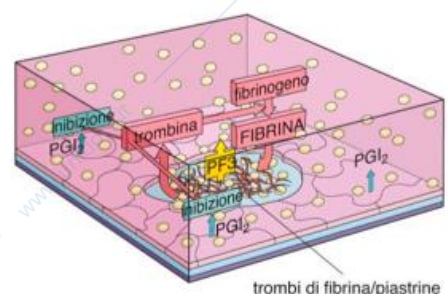
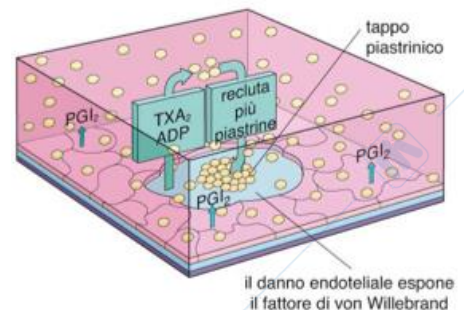
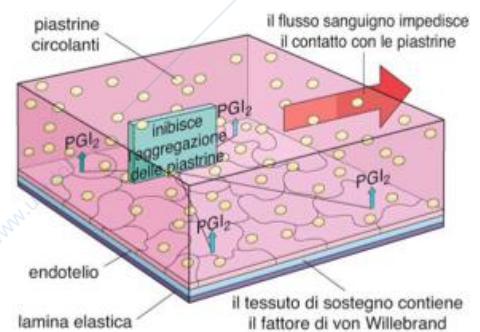
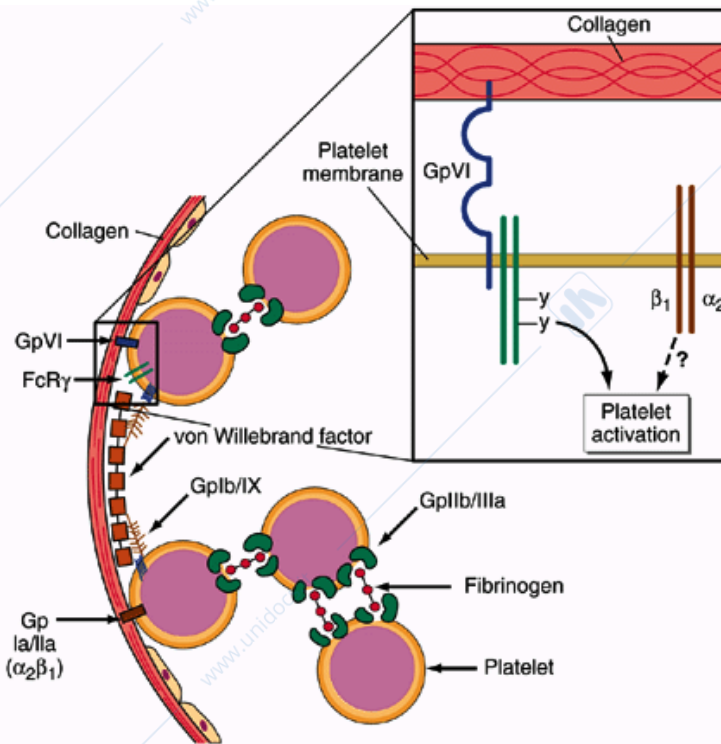
- Trombossano che deriva dal metabolismo dell'acido arachidonico.
- ADP
- PDGF(*platelet derived growth factor*)
- Fattore di von Willebrand
- Fibrinogeni

Tutti questi fattori rilasciati servono per passare alla fase successiva, ovvero per attivare il sistema della coagulazione.

In un endotelio sano le piastrine scorrono col sangue, la superficie endoteliale è per definizione anti-adesiva e anti-aggregante. Una volta che viene danneggiato diventa pro-adesivo, ovvero abbiamo l'adesione al subendotelio e quindi al collagene, si forma il tappo piastrinico e dalle piastrine fuoriescono ADP e trombossano. Questi a loro volta richiamano altre piastrine e le fanno aderire. L'endotelio ha una funzione fondamentale in questa fase perché diventa pro-adesivo esponendo il collagene e pro-aggregante perché libera il *tissue factor*(TF) responsabile dall'attivazione del fattore settimo(parte della cascata coagulativa). Dopo il tappo piastrinico, si attiva la cascata coagulativa che agisce sulla trombina e agisce sul fibrinogeno formando alla fibrina.

Formazione della fibrina

La cascata può iniziare in diverse maniere, con la liberazione del *tissue factor* o con l'attivazione sequenziale dei vari fattori

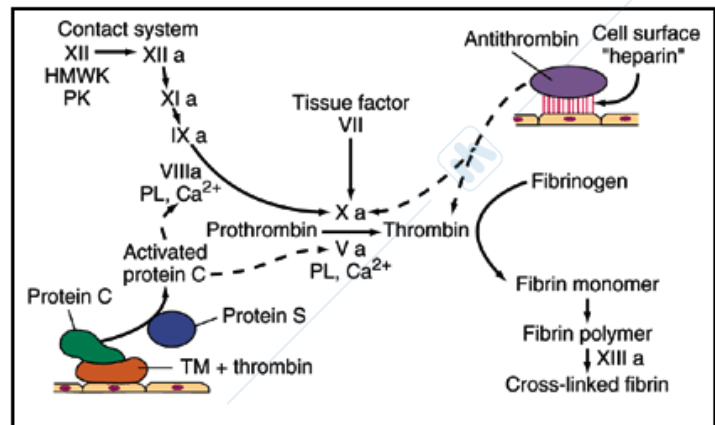


XII, XI, IX e VIII sino ad arrivare al fattore decimo(Xa) che attiva la protrombina in trombina capace di agire sul fibrinogeno per trasformarlo in fibrina. La fibrina inizialmente è monomerica, poi polimerizza e infine forma delle proteine che tra loro fanno *cross-link* solidificando la struttura ed inglobando anche altre cellule come eritrociti e globuli bianchi.

L'eparina(anticoagulante) ha un effetto diretto negativo sulla trombina e impedisce che questa, anche se si attiva, agisca sul fibrinogeno e lo faccia diventare fibrina.

Altri sistemi di inibizione simili agiscono sulla conversione di pro-trombina a trombina oppure sulla cascata coagulativa.

I fattori della coagulazione vengono indicati con i numeri romani ma hanno anche dei nomi propri: il fattore I è il fibrinogeno, il II è la pro-trombina e il III è il *tissue factor*.



Fase fibrinolitica

La plasmina è un enzima che si occupa della disgregazione del coagulo o del trombo.

Questa deriva dall'attivazione del plasminogeno e si occupa di digerire la fibrina dando origine a prodotti di degradazione del trombo o del coagulo. Il plasminogeno non è un elemento limitante, è largamente disponibile a differenza dell'attivatore del plasminogeno(PA) che manca e deve essere attivato di più. E' un enzima che permette l'attivazione del plasminogeno a plasmina. PA è presente fisiologicamente, così come la urochinasi(enzima che può svolgere la stessa funzione). E' così importante attivare il plasminogeno che il suo attivatore è già stato prodotto per via ricombinante(tPA) per curare i pazienti a rischio trombotici. E' stato il primo farmaco licenziato di origine biotecnologica.

Patologie dell'emostasi

Alterazioni dell'emostasi primaria

Possiamo avere la piastrinopenia, ovvero una carenza del numero di piastrine nell'organismo dovuta a:

- Diminuita produzione midollare di megacariociti per
 - Fibrosi o tumore midollare, in cui anziché tessuto ematopoietico abbiamo del tessuto fibrotico o
 - Aplasia midollare(diminuzione del numero di cellule del midollo in seguito a trattamenti)
- Aumento sequestro splenico. La milza è un organo deputato a eliminare i globuli rossi senescenti, quindi ha una doppia circolazione: una è la circolazione normale, un'altra va in una zona più lenta contenente sinusoidi che permettono la classificazione dei globuli rossi, quelli senescenti si attaccano(meno flessibili) e vengono eliminati. Se la funzione della milza è alterato per problemi di splenomegalia le piastrine vengono trattenute perché c'è più sangue e la milza è più ingrossata. Le piastrine diventano carenti in periferia a causa di:
 - Splenomegalia,
 - Tumori,
 - Ipertensione portale. La vena porta trova nel fegato cirrotico un ostacolo(il flusso non è adeguato) e il sangue, non riuscendo a passare, si ferma a monte ovvero negli organi da cui dovrebbe normalmente defluire. Il sangue ristagna, anche nella milza perché la vena porta è ostruita.
- Aumentata distruzione o utilizzo delle piastrine in periferia che può essere dovuto a:
 - Cause immunologiche, ad esempio malattia autoimmune con anti-corpi anti-piastrine.
 - Immunocomplessi

→ Situazioni non veramente immunologiche, come le protesi vascolari e le valvole cardiache esogene. Sono sempre dei materiali estranei che le piastrine vedono come una zona a cui aderire, infatti i problemi legati all'utilizzo di protesi sono dovute alle piastrine che possono formare dei veri e propri trombi.

Inoltre, possiamo avere una carenze di funzionalità delle piastrine, correlata o meno con la carenza in numero. Queste sono dovute a:

- Difetti di adesione
 - Malattia di von Willebrand, patologia genetica in cui manca il fattore di von Willebrand e quindi le piastrine sono incapaci di legarsi tra di loro.
 - Sindrome di Bernard Soulier, caratterizzata dall'assenza di GpIb (utile per far aderire le piastrine all'endotelio). Questo difetto genetico è importante sia per le piastrine sia per i processi infiammatori perché è la stessa glicoproteina che permette la migrazione dei leucociti nell'interstizio.
- Difetti di aggregazione, per assenza di GpIIb e GpIIIa.
- Difetti di secrezione, in cui non c'è più degranolazione piastrinica.
 - Blocco della ciclossigenasi (COX), parte del metabolismo dell'acido arachidonico. E' il bersaglio dell'aspirina: agisce sull'acido arachidonico che porta alla formazione di prostaglandine e trombassano. Bloccandola si impedisce alle piastrine di aggregarsi.
- Difetti granuli

Quando ci sono poche piastrine circolanti possono comparire le petecchie. Sono delle micro-emorragie che si verificano sotto cute dovute all'assenza di piastrine o alla capacità delle stesse di aggregarsi. Si possono formare anche attorno agli occhi dei bambini che hanno vomitato da poco, perché c'è stata una rottura di capillari dovuta allo sforzo.

Inoltre, la carenza di piastrine

Malattia di von Willebrand

E' una malattia autosomica dominante (si trasmette a tutte le generazioni) che riguarda il gene che codifica per il fattore di von Willebrand nel cromosoma 12. Il fattore può essere assente o prodotto in maniera minore rispetto al fisiologico. La patologia comporta una tendenza alle emorragie spontanee eccessive, dopo piccoli interventi chirurgici (estrazioni dentarie). Provocano epistassi (perdita di sangue dal naso), gengivorragie, eccessiva durata e flusso di mestruazioni che si riflette in anemia, emorragie cutanee più lunghe, eccessivo sanguinamento per lesioni superficiali. E' la formazione iniziale del tappo piastrinico che non funziona bene, non l'emorragia secondaria.

Alterazioni dell'emostasi secondaria

Avvengono nella fase coagulativa. Possiamo avere emorragie interne importanti dovute a:

- Deficit congeniti o acquisiti di uno o più fra i fattori della coagulazione. Ne è un esempio l'emofilia: assenza completa di alcuni dei fattori della coagulazione, emofilia A (fattore VIII) o emofilia B (fattore IX). Abbiamo la morte se non si interviene ogni 10 giorni con la trasfusione del fattore, oggi prodotto con metodi ricombinanti mentre una volta veniva estratto dal plasma di donatori (plasmaferesi).
- Eccessiva attività del meccanismo della fibrinolisi
- Ereditari, come l'emofilia
- Acquisiti, per esempio per carenze nella dieta (deficit di vitamina K o DIC) o per patologie epatiche (produce i fattori della coagulazione)

Questo sistema è utile perché a livello dei diversi organi abbiamo sempre dei micro traumi, lo stomaco ad esempio ne subisce molti ogni giorno. Anche le articolazioni importanti come quelle a livello del ginocchio e della caviglia vanno incontro a piccoli traumi tutti i giorni.

Emofilia

Si divide in emofilia A, carenza del fattore ottavo, e emofilia B, carenza di fattore nono. E' una malattia recessiva legata a cromosoma X, su cui si trova il gene e la malattia viene manifestata solo dai soggetti maschili che hanno la madre portatrice della patologia. Questo tipo di patologie sono dette *X-linked*. Fino all'introduzione della terapia con il fattore ottavo, il paziente moriva prima di raggiungere la pubertà.

I sintomi sono gli ematomi che si formano molto facilmente, i sanguinamenti spontanei alle articolazioni con dolore e gonfiore, emorragie gastrointestinali o del tratto urinario con sangue nelle urine e nelle feci. Sanguinamenti prolungati dopo interventi, ferite o estrazioni dentarie.

Trombosi

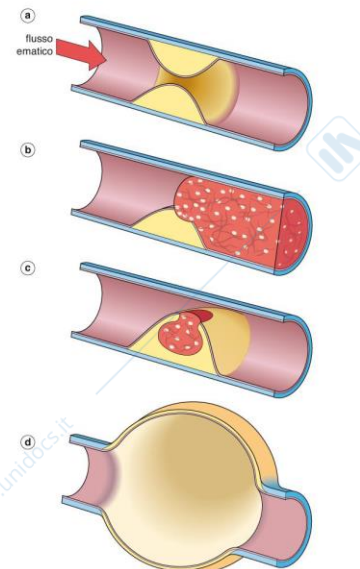
La patologia è dovuta ad un eccesso di coagulazione. Si formano dei coaguli all'interno di un vaso integro con formazione di un trombo sulle arterie in corrispondenza di una placca arteriosclerotica, ma si possono trovare anche a livello venoso.

Un trombo è formato da piastrine aggregate, maglie di fibrina e cellule intrappolate sia RBC che leucociti. Si parla di "trombo rosso" nel caso venoso perché il sangue scorre più lentamente e quindi si fermano più globuli rossi, mentre i trombi arteriosi sono detti "trombi bianchi" per la presenza di globuli bianchi. In sezione istologica, la struttura si presenta striata: il tessuto è organizzato in maniera lamellare, abbiamo strati di piastrine che si alternano a strati di fibrina e RBC.

Cause e conseguenze della trombosi

Furono descritte da Virchow nel 1860, per questo oggi sono chiamate "triade di Virchow":

- Alterazione della parete vasale, come nell'aterosclerosi e negli aneurismi.
- Cambiamento della composizione del sangue: aumento del numero di piastrine (per disfunzioni midollari), ipercoagulabilità (per iperattivazione vasale) o ridotta fibrinolisi.
- Cambiamenti della velocità del flusso di sangue, generalmente genera trombi venosi. Il ritorno venoso ha un flusso lento, se abbiamo fenomeni di stasi circolatoria o un ritorno venoso insufficiente il rischio di trombosi aumenta.



A. Stevens, J. Lowe, I. Scott Patologia, terza edizione Copyright 2010 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

Le conseguenze sono sempre un blocco della circolazione:

- In ambiente arterioso, si ha l'ostruzione a valle con formazione del trombo e ischemia acuta.
- In ambiente venoso, il blocco è sempre a valle del flusso ma il sangue è diretto verso vasi di calibro sempre più grosso, quindi il trombo che si forma non occlude nulla. Il trombo venoso non dà ischemia perché può staccarsi e muoversi attraverso dei vasi più grossi. I trombi circolano fino ad arrivare al filtro polmonare, abbiamo così un'embolia polmonare.

Il trombo può essere digerito dal sistema fibrinolitico (tPA), quindi l'attivazione della plasmina porta ad una ricanalizzazione del vaso, si riorganizza.

Trombo-embolia

È un'ostruzione di un vaso da parte di materiale trasportato dal sangue. I trombi possono essere gassosi, derivare dal distacco di una porzione di un altro trombo o un frammento di tumori (si sfaldano parecchio), derivare da ammassi batterici (batteremia importante) o corpi estranei.

Le trombo-embolie si possono generare in seguito a:

- Cardiopatie a livello delle coronarie,

- Endocarditi,
- Stenosi mitralica, in cui la valvola mitralica si irrigidisce e si formano dei trombi sopra.
- Infarto del miocardio
- Arteriopatie, trombi dovuti a placche arteriosclerotiche.
- Emboli venosi che si originano dalla vascolatura profonda (organi distanti dal cuore in cui la stasi si somma alla difficoltà di far rientrare il sangue a cure).

I trombi venosi sono sempre legati alla stasi e possono essere occlusivi, come quelli delle vene varicose. Si formano spesso a livello delle valvole presenti lungo le vene. Colpiscono sia le vene superficiali (dette "vene varicose") che quelle profonde delle gambe.

I trombi nelle vene superficiali interessano la safena in presenza di varici causano dolore, congestione, gonfiore ma embolizzano raramente. Possono dar luogo a **trombo-flebiti**: infiammazioni delle vene superficiali a cui si aggiunge la coagulazione vasale. L'origine della patologia è infiammatoria. Il trombo aderisce molto all'endotelio, la zona si gonfia perché i liquidi trasudano per mancanza di ritorno sanguigno, anche se non abbiamo il distacco di frammenti di trombo. E' dovuta a stasi circolatorie per immobilità prolungata, ma anche da usi di contraccettivi ad elevati contenuti di estrogeni.

I traumi che ne derivano sono insufficienza cardiaca.

I trombi nelle vene più profonde (poplitee, femorali, iliache) invece possono dare grossi problemi perché possono embolizzare. Nel 50% dei casi la patologia è asintomatica, altrimenti si riconoscono da dolore ed edema. Possono causare il **trombo-embolismo massivo polmonare**, arrivando al cuore destro fino al circolo polmonare.

I trombi si formano anche a seguito di un intervento chirurgico che impedisce al paziente di muoversi per molto tempo (gli viene somministrato anti-coagulante).

Esistono anche malattie genetiche o acquisite di trombofilia. Il termine indica un eccessivo numero di piastrine o un'eccessiva aggregazione piastrinica. I pazienti vengono colpiti intorno a 40-45 anni di età e si trovano in un stato di iper-coagulabilità (iper-trombotico). Soffrono molto di flebiti e iper-flebiti. Hanno vene eccessivamente dilatate, allungate e tortuose. Il fenomeno è più frequente nella donna rispetto all'uomo (5:1).

Trombocitemia essenziale (TE) o idiopatia

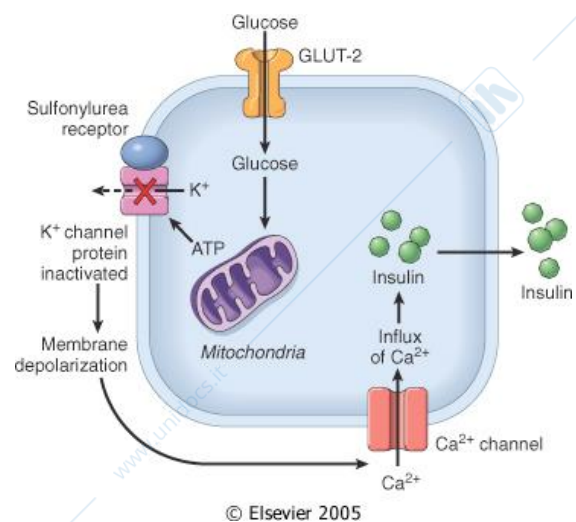
E' una malattia mieloproliferativa a livello midollare in cui abbiamo l'aumento del numero di piastrine periferiche (fino a 600 mila). La patologia è rara, solitamente si ha un decorso benigno. Si assumono gli stessi farmaci utilizzati nella terapia anti-tumorale perché bisogna contrastare l'eccessiva produzione di piastrine. Alle volte, i pazienti non vanno incontro a tante trombosi perché le piastrine sono molte ma non tutte funzionano.

3/05/2016

DIABETE MELLITO

Il diabete mellito invece riguarda un'alterazione della glicemia. Questa patologia si distingue dal diabete insipido che presenta un'anomalia dell'acido salicilico. Si parla di una "serie di diabete" perché abbiamo molti disordini metabolici. Il fenotipo comune dal diabete nell'anziano al diabete genetico è l'iperglicemia. Il pancreas ha all'interno di sé delle cellule endocrine chiamate cellule del Langerhans che permettono la regolazione della glicemia. Nel pancreas endocrino ci sono 3 tipi di cellule fondamentali, in successione sempre meno presenti:

- ❖ Cellule β che fanno l'insulina,
- ❖ Cellule α che producono glucagone,

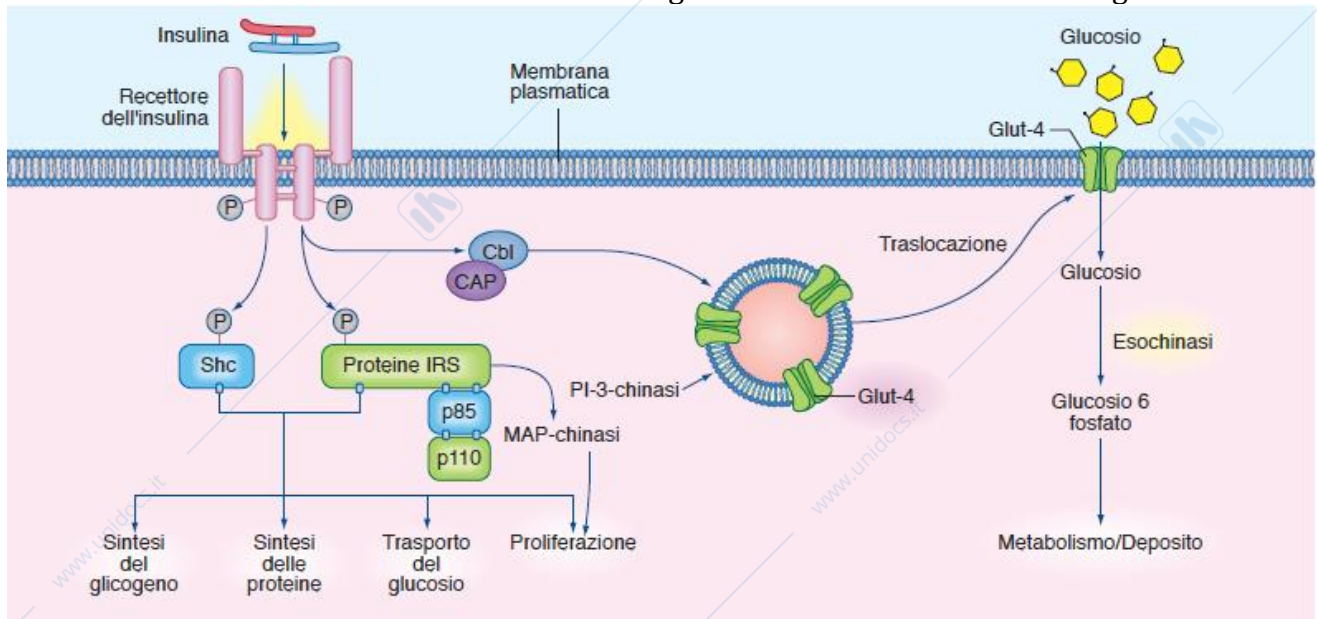


❖ Cellule δ che producono la somatostatina.

Ci sono alcune cellule del nostro organismo che non sopportano bene le variazioni di glicemia, come quelle del sistema nervoso. Il sistema pancreatico fa in modo che la glicemia si mantenga costante. La regolazione è fine, puntuale e precisa: l'insulina è l'ormone ipoglicemizzante dell'organismo umano. Dopo aver pranzato, il glucosio in circolo è molto. Il trasportatore GLUT-2 sulla cellula β -pancreatica che non è insulino-dipendente funziona con una diffusione passiva. La cellula β sente la concentrazione di glucosio a livello ematico, lo fa entrare, attiva una serie di meccanismi e abbiamo una depolarizzazione di membrana, ingresso di calcio che permette di rilasciare l'insulina preformata in vescicole. Nell'arco di pochi minuti, il glucosio assunto agisce e libera insulina. Il glucosio, inoltre, permette di stimolare il rilascio sostenuto di insulina ex novo per il tempo necessario ad abbassare la glicemia a valori basali.

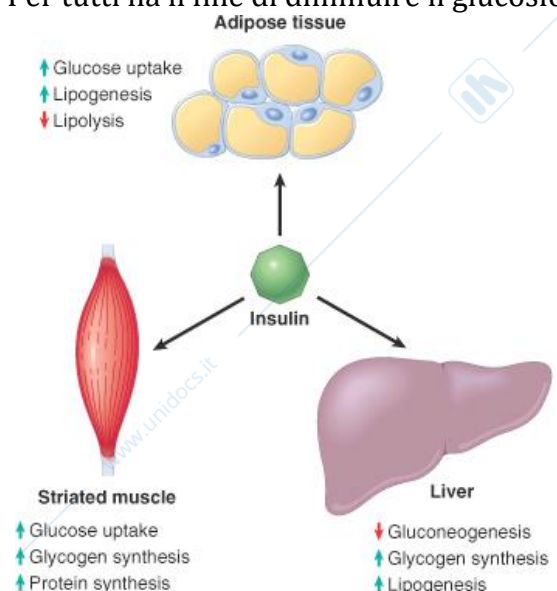
Il cortisolo è un ormone iperglicemizzante che produce un picco glicemico, l'insulina funziona altrettanto in fretta ma in senso contrario. Inoltre l'insulina è un fattore di crescita che contribuisce alla proliferazione cellulare, ha funzioni mitotiche, sintetizza glicogeno e proteine e trasporta glucosio.

L'insulina per abbassare la glicemia deve fare in modo che il glucosio ingerito venga immagazzinato o utilizzato. L'insulina va sui recettori delle cellule e fa fondere le vescicole contenenti il GLUT-4 per far sì che il glucosio venga internalizzato. Questo meccanismo permette di attivare la via metabolica di fosforilazione del glucosio in modo che esso rimanga nella cellula.



L'insulina agisce su tessuto adiposo, muscolo e fegato. Per tutti ha il fine di diminuire il glucosio:

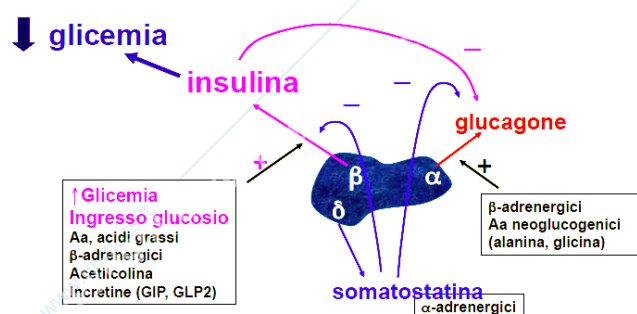
- Nel tessuto adiposo inibisce la lipolisi e aumenta lipogenesi e uptake di glucosio;
- A livello del muscolo striato, viene attivata la sintesi di glicogeno: il muscolo scheletrico e fegato hanno la possibilità di captare glucosio, fare sintesi proteica in parte e depositarla come glicogeno in altra.
- Nel fegato viene inibita la gluconeogenesi, questo organo è l'unico capace di sintetizzare glucosio ex novo. La regolazione di glicemia è fondamentale durante lunghi periodi di digiuno. Anche qui viene attivata la glucogenesi.



Nel pancreas, quando c'è un rialzo della glicemia la cellula β rilascia insulina che abbassa la glicemia ma è anche capace di inibire le cellule α del pancreas che rilasciano glucagone. Il glucagone che è iperglicemizzante deve essere inibito all'istante.

Se non ho insulina in circolo, il glucagone viene rilasciato e quindi avrò iperglicemia. La somatostatina prodotta dalla cellule δ ha un effetto di tipo inibitorio, inibisce la secrezione sia di insulina che di glucagone, regolando l'azione delle cellule β e α così che il sistema sia all'equilibrio. Se io mangio parecchio, ho un picco di secrezione di insulina che abbassa la glicemia ma siccome il controllo è omeostatico l'insulina abbassa troppo la glicemia, per questo si ha un picco di glucagone. I due fattori oscillano fino a che non si stabilizzano, se non avessimo questo doppio controllo la glicemia non sarebbe mai in concentrazioni più o meno costanti.

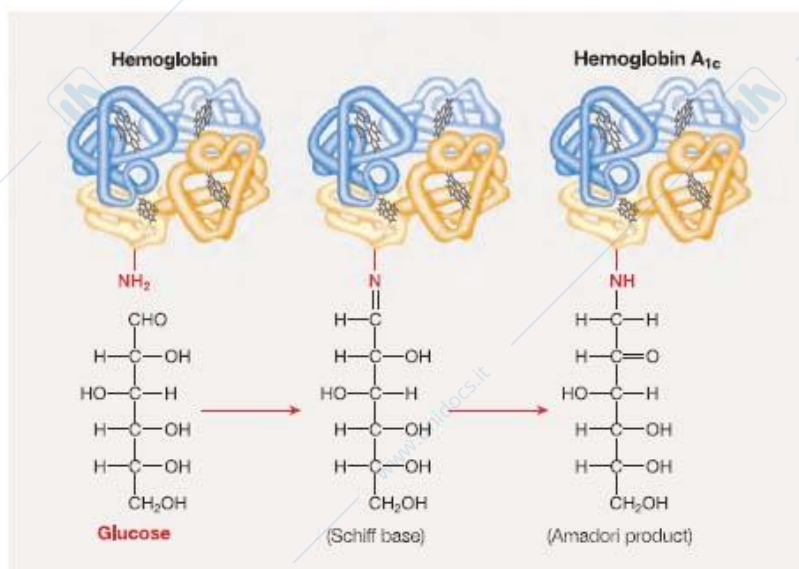
Quando ho una situazione di iperglicemia qualcosa nell'attività dell'insulina non è funzionante al 100%. I diversi tipi di diabete mellito si possono classificare come una sindrome determinata da un difetto di secrezione dell'insulina o un difetto di attività dell'insulina. In questo modo, con la prevalenza di una o dell'altra delle situazioni (o la presenza di entrambi) definisco tutte le situazioni possibili di diabete mellito.



Per diagnosticare il diabete, devo fare una misurazione della glicemia del paziente che sia a digiuno da almeno 8 ore. Se la glicemia è maggiore o uguale a 126 mg/dL allora il paziente è diabetico. Inoltre, posso fare OGCT (*oral glucose tolerance test*): a digiuno misuro la glicemia poi faccio assumere al paziente mezzo litro di acqua con 75 grammi di glucosio disciolto e dopo due ore misuro di nuovo per vedere se il corpo sa rispondere al carico glicemico. Se ho più di 200 mg/dL allora il paziente potrebbe essere diabetico, lo stesso valore vale se faccio una misura random in un momento qualunque della giornata.

Dal 2010, si considera l'emoglobina glicata (A_{1c}) come primo test per diagnosticare il diabete. Quando abbiamo un'iperglicemia prolungata nel tempo, il glucosio in circolo si lega all'emoglobina e ad altre proteine per cui ha alte affinità. Il legame è irreversibile, ciò forma l'emoglobina glicata che può essere dosata. L'emoglobina glicata sarebbe sufficiente per dare la diagnosi di diabete perché si forma in quantità elevata quando ho un'iperglicemia che dura da almeno 120 giorni (3 mesi), ovvero la vita media di un globulo rosso. Il valore di normalità è un range tra il 5,7 e il 6,5% di emoglobina. La diagnosi dell'emoglobina glicata ai fini della patologia è molto più importante perché il diabete è molto governabile anche se le complicanze croniche del diabete possono portare a morte del paziente per insufficienza renale, nella maggior parte dei casi. È fondamentale capire da quanto tempo la persona che ho di fronte è diabetica, con gli esami classici non posso sapere da quanto tempo la glicemia è elevata, l'emoglobina glicata è l'unico modo per sapere se il paziente ha iperglicemia da diversi mesi (da almeno 3 mesi, il periodo sufficiente per aver dei danni).

I sintomi del diabete sono banali: il soggetto iperglicemico filtra il sangue a livello renale e non lo riassorbe del tutto, quindi abbiamo



la glicosuria che si diagnostica solo con l'esame delle urine.

Se perdiamo glucosio con le urine questo si richiama acqua, ovvero il paziente urina più spesso e si sveglia la notte. Inoltre, la perdita di acqua attiva il centro ipotalamico della sete che percepisce la disidratazione porta il paziente ad avere più sete.

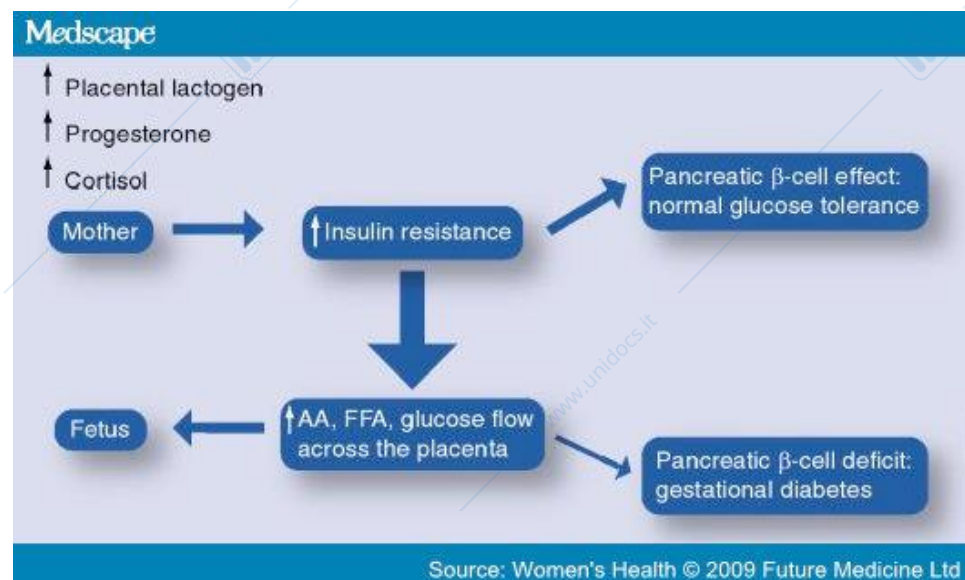
In realtà, lo sbilancio tra insulina e glucagone si manifesta come un eccesso di glucagone che mobilizza grassi e proteine determinando l'acidosi metabolica che può sfociare nel coma metabolico(acidotico). Non è una situazione sovente nel paziente anziano, ma è spesso l'evento che sottolinea il diabete di tipo I nei bambini.

Classificazione dei tipi di diabete:

- **Diabete di tipo I:** è la forma più grave, è una patologia su base autoimmune che scatena una risposta anomala che porta alla distruzione delle cellule β -pancreatiche. Questo paziente non può più produrre insulina, per tutto il resto della vita. Può sopravvivere solo se si inietta insulina, per questo era detto "diabete insulino-dipendente".
- **Diabete di tipo II:** era detto non insulino-dipendente, ma con l'andare degli anni anche qui non si produce più insulina. C'è una base poligenetica, non sappiamo da cosa derivi. E' caratterizzato da un'insulino-resistenza periferica. E' considerato diabete dell'adulto, insorge con sintomi banali tra i 45-50 anni. Non è vero che alla base abbiamo un recettore non funzionante.
- **Altri tipi di diabete:** sono tutte quelle situazioni che definiamo diabete ma hanno alla base motivi diversi dal classico diabete I e II. Rientrano i casi in cui il diabete è dovuto a un deficit genetico della cellula β , dell'azione dell'insulina(mutazione del recettore o di mutazione della trasduzione del segnale). Questi casi sono raramente distribuiti nel mondo. Fanno parte di questa categoria anche i diabete dovuti ad altre patologie come malattie del pancreas esocrino o tumori che distruggono le cellule β . Alcuni farmaci possono creare situazioni simil-diabetiche, alcune endocrinopatie, infezioni o forme rare di malattie immunitarie.
- **Diabete gestazionale**

Quest'ultima patologia è un'intolleranza al glucosio di grado variabile che si instaura o viene diagnosticata per la prima volta durante una gravidanza. La patologia coinvolge il feto. La diagnosi insorge tipicamente tra il quinto o sesto mese di gestazione, solitamente si tratta del diabete di tipo II. Questo diabete insorge nella madre al quinto/sesto mese perché in quel momento ha una quantità di ormoni esagerata che contrasta l'insulina, inoltre il feto sta crescendo quindi richiede un apporto energetico molto alto. La madre utilizza i grassi per sopravvivere, mentre il glucosio di pronto utilizzo viene usato dal fegato. La mamma risulta quindi un po' iperglicemica, l'insulina non passa la placenta quindi le viene somministrata. Il pancreas del feto produce insulina che abbassa la glicemia ma svolge anche effetti da fattori di crescita, quindi i neonati sono più grassi. Il ruolo dell'insulina non è solo benefica perché il bambino sviluppa macrosomia, ha le spalle larghe e l'addome più grosso e ciò impedisce al bambino di uscire. Ci può essere emorragia per la madre e il bambino soffrirebbe. Inoltre, il bambino può avere sofferenza

respiratoria perché non ha il surfactante nei polmoni in quanto nasce prematuramente perché ha già raggiunto il peso e quindi ha abbastanza fattori necessari alla nascita. Possiamo



Source: Women's Health © 2009 Future Medicine Ltd

anche avere iperglicemia alla nascita,

L'iperglicemia nella madre regredisce entro pochi mesi normalmente, ma non è detto che il soggetto non sia a rischio di sviluppare diabete in età anziana perciò è bene che inizi prima i controlli.

Il diabete di tipo I ha una predisposizione genetica, la patologia compare quando ormai le cellule pancreatiche sono morte all'80%. I sintomi non sappiamo da cosa sono scatenati, si presentano dopo 10-12 anni dall'inizio della patologia.

Il diabete di tipo II non è una malattia di tipo insulino-dipendente, perché il paziente produce un'insulina che non funziona bene. All'inizio l'insulina viene prodotta ma il paziente ne secerne sempre di più perché non la usa correttamente. Il soggetto va incontro ad esaurimento, non produce più insulina. Prima è resistente, poi diventa incapace di produrla.

Complicanze acute del diabete mellito

Nel diabete di tipo I è molto frequente la chetoacidosi diabetica. Un eccesso di glucagone provoca un aumento della lipolisi e della β -ossidazione degli acidi grassi portando all'aumento dei corpi chetonici circolanti. Gli effetti più evidenti sono tachicardia e ipotensione fino ad alterazioni delle funzioni mentali.

Nel diabete di tipo II invece è più frequente l'iperosmolarità non chetonica dovuta ad un apporto idrico non adeguato per una riduzione del volume sanguineo. La diminuzione del volume ematico ha come conseguenza la riduzione dell'escrezione di glucosio con le urine e quindi un forte aumento dell'osmolarità plasmatica. Abbiamo così un'ipertensione ortostatica e sintomi neurologici che possono sfociare nel coma.

Complicanze croniche del diabete mellito

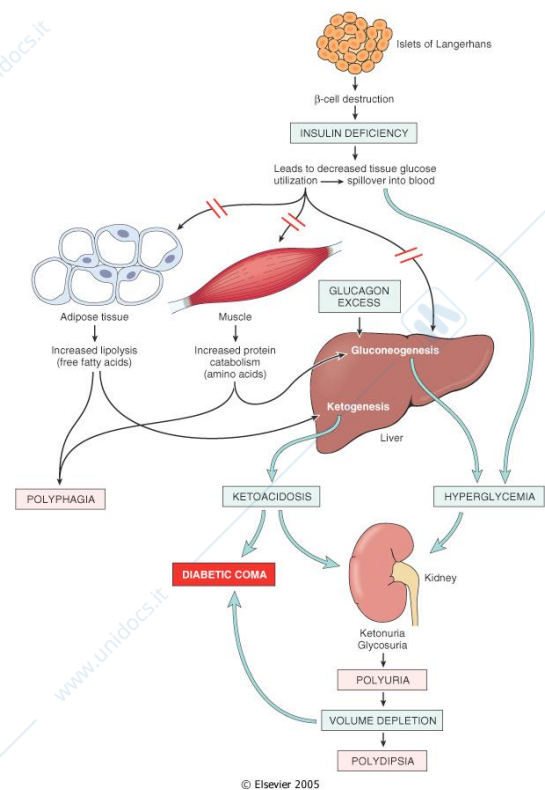
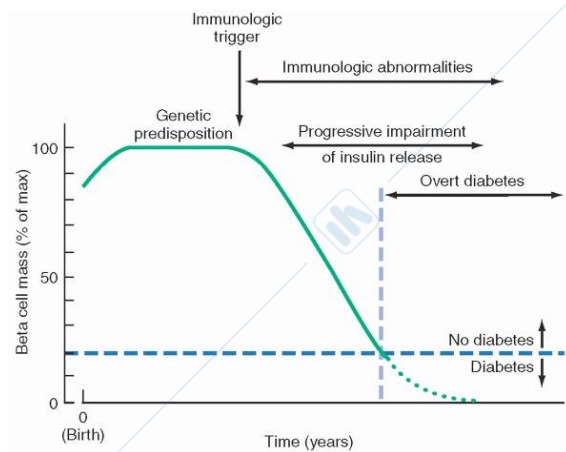
Più rimane alta la glicemia, più gravi sono le conseguenze.

Le complicanze sono non vascolari:

- *Neuropatie periferiche*. I soggetti non sono sensibili al dolore, le terminazioni periferiche non svolgono più la loro funzione.
- *Alterata cicatrizzazione*: anche le immunoglobuline sono glicate, c'è una forte capacità di infettarsi e si fa fatica a cicatrizzare si può arrivare alla necrosi del tessuto. Si possono avere anche ulcere.
- *Anomalie gastro-intestinali*, come diarrea e gastroparesi.
- *Disfunzioni all'apparato genito-urinario*, soprattutto legati all'impotenza nell'uomo.

Altri problemi vascolari sono le macro e le micro angiopatie che *umentano i rischi di infarto*, portano a retinopatia (piccoli vasi della retina vanno incontro a meccanismi angiogenetici e si ha cecità).

Il rene è il primo organo che viene colpito in modo insidioso: si ha lo sviluppo della nefropatia diabetica, alterazione della capacità filtrante della membrana del glomerulo che non filtra più in modo selettivo. Si ha un ispessimento della membrana filtrante del rene e un'ipertrofia



glomerulare. L'evento ha inizio subito, ma il periodo silente è di 10-15 anni e ce ne si rende conto quando si ha un blocco o un'insufficienza renale. Questa anomalia produce inoltre microalbuminuria che porta alla perdita di proteine. In un esame delle urine si cercano le albumine, la microproteinuria indica che il paziente perde poche proteine. Se vado a fare l'esame delle urine, l'albumina la escrete ma la riassorbo ma se il mio rene è diabetico perdo albumina per tanti anni senza accorgermene.

L'emoglobina glicata e questo esame mi danno la certezza che il paziente è diabetico.

5/05/2016

MALATTIE GENETICHE

Si tratta di errori di morfogenesi. Dobbiamo distinguere le patologie di tipo ereditario (in cui il gene si trasmette per via germinale) dalle malattie congenite che riguardano l'individuo dalla fecondazione per tutto lo sviluppo fetale.

Le malattie su base ereditaria si possono distinguere in malattie monogeniche e poligeniche in base alla quantità di geni che sono coinvolti nell'alterazione patologica: l'emofilia e l'ipercolesterolemia familiare sono un esempio di difetto monogenico, mentre i tumori e l'ipertensione sono sempre dei difetti poligenici (sono mutazioni somatiche).

Le embriopatie o fetopatie possono invece portare ad errori di morfogenesi. Tra le malattie largamente definite come difetti genetici le cause sono al:

- 70% sconosciute,
 - 20% malattie ereditarie,
 - 4% malattie citogeniche,
 - 2% dovuti a farmaci, sostanze chimiche e radiazioni,
 - 2% infezioni materne
- ed il restante a fattori metabolici materni e traumi da parto.

Le malattie genetiche possono essere:

- Malattie cromosomiche: mancanza totale o presenza in eccesso di un cromosoma che solitamente non è compatibile con la vita oppure la presenza di un cromosoma in più, come accade ad esempio nella sindrome di Down.
- Malattie multifattoriali: causate dall'interazione di molti geni diversi accoppiati a fattori esogeni o ambientali. La loro trasmissione ereditaria è complessa ed in gran parte sconosciuta. Ogni individuo reagisce in modo diverso alle radiazioni, ad esempio, alcuni individui sanno riparare il DNA, mentre coloro che hanno p53 mutata non sono in grado.
- Malattie legate ad ereditarietà mitocondriale: prodotte dall'alterazione del DNA mitocondriale che si trasmette solo per via femminile. Il DNA viene trasmesso soltanto attraverso la cellula uovo perché gli spermatozoi non hanno mitocondri. Questo DNA mitocondriale deriva da un'alga simbiotica entrata nelle cellule per produrre energia. Le malattie monogeniche, dette anche mendeliane,
- Malattie monogeniche: determinate da un solo gene mutante, sono trasmesse con un meccanismo di tipo mendeliano. Al momento sono 15 mila identificate ma ce ne sono molte altre che sono difficili da studiare perché colpiscono pochi individui. Queste malattie si distinguono in autosomiche o eterosomiche. Nel primo caso, il gene coinvolto fa parte dei 23 cromosomi della cellula, mentre nelle malattie eterosomiche questo gene mutato si trova nel corredo dovuto alle cellule sessuali.

Le malattie autosomiche dominanti indicano che basta un allele di un genitore mutato perché la malattia si manifesti. Tutti gli individui che presentano questo allele avranno la patologia, anche se sono eterozigoti.

Le malattie autosomiche dominanti hanno due caratteristiche:

- Penetranza: frequenza con la quale un gene dominante produce un effetto fenotipico evidenziabile.
- Espressività: variabilità e entità dell'effetto fenotipico, ovvero la gravità della malattia.

Nelle **malattie autosomiche dominanti** la penetranza è del 100% perché il gene passa a tutte le generazioni, mentre nelle malattie recessive il carattere passa solo ad alcuni della prima generazione ma si ritrova nella seconda generazione anche da genitori che non lo manifestavano. La malattia si è quindi manifestata con il 50% di penetranza, in questa prima generazione la persona non ha manifestato fenotipicamente la malattia ma l'aveva nel suo corredo cromosomico.

- L'ipercolesterolemia familiare è una delle malattie con espressività e penetranza diverse tra loro, nella stessa famiglia l'espressività è diversa. I livelli di colesterolo sono variabili da persona a persona, con penetranza diversa. E' una delle malattie con diversità fenotipica. Le mutazioni del gene dell'ipercolesterolemia familiare sono tante.
- La poliposi familiare del colon che predispone al tumore al colon.
- Sferocitosi ereditaria, coinvolge i globuli rossi che diventano sferici.
- Corea di Huntington, malattia neurodegenerativa. 5/10 casi su 100mila nati, le manifestazioni fenotipiche insorgono intorno ai 30-40anni con movimenti involontari: la deambulazione è difficoltosa, manca di coordinazione, si ha disatria, si perde la parola, la deglutizione e la demenza. Il decorso è lento e progressivo, avviene in circa 15 anni. Fu studiata da Huntington nel 1871, ma il gene fu scoperto nel 1983. E' il gene che codifica per l'AA glutammina che normalmente si trova ripetuta 10-30 volte nei corredi normali, mentre si trova da 36 a 120 volte nei malati. Si perde la protezione nei neuroni per apoptosi nel corpo striato, finchè non si arriva alla corteccia neuronale.
- Malattia di Von Willebrand

Le **patologie autosomiche recessive** necessitano di entrambi i genitori portatori: deriveranno il 50% di portatori asintomatici, il 25% sani e il 25% malati. Tutti i geni oncosoppressori (come Rb) manifestano la loro affinità quando sono omozigoti.

Nell'albero genealogico possiamo avere dei salti di generazione perché se un individuo portatore si incrocia con uno non portatore non si manifesta la malattia. Occorre che si incrocino due eterozigoti, le anemie e le talassemie ne sono un esempio. Anche in questo caso non abbiamo differenza di sesso perché i geni sono sempre autosomici. Alcuni esempi di malattie autosomiche recessive sono:

- ✓ Alcune forme di sordità e cecità;
- ✓ Talassemie come l'anemia falciforme;
- ✓ La fibrosi cistica, o mucoviscidosi.

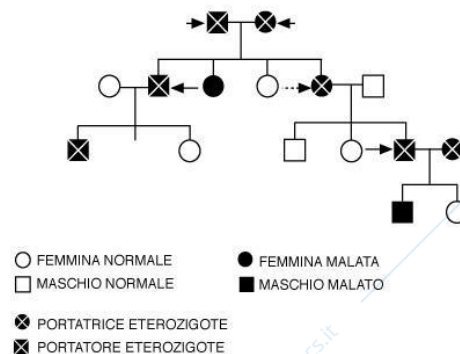


FIGURA 7-17. Albero genealogico di una malattia autosomica recessiva. Entrambi i genitori all'inizio dell'albero genealogico (*freccie piccole*) sono portatori asintomatici (eterozigoti) per la malattia. Una figlia (omozigote) è malata e non è sposata, mentre l'altra figlia è una portatrice eterozigote (*freccia tratteggiata*) e si è sposata con un marito normale. Uno dei figli è portatore eterozigote (*freccia grande a destra*) ed ha sposato una donna eterozigote. Essi hanno due figli: un maschio che ha la malattia (omozigote) ed una figlia normale. Ritornando al figlio maschio eterozigote di prima generazione (*freccia grande a sinistra*), si è sposato ed ha avuto tre figli. Uno dei suoi figli è portatore eterozigote, mentre i rimanenti due sono normali.

E' una malattia multisistemica che interessa tutte le ghiandole esocrine (pancreas, cellule mucipare del polmone, ghiandole sudoripare e dotti seminiferi da cui può derivare sterilità). Questa patologia coinvolge la CFTR (= *cistis fibrosis transmembrane regulator*) ovvero una proteina che ha due grosse porzioni di domini transmembrana

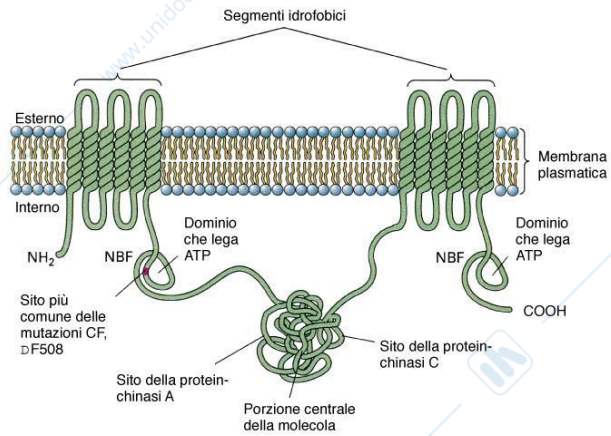


FIGURA 7-18. Struttura proposta per il regolatore del trasporto transmembrana della fibrosi cistica (CFTR). La proteina ha due segmenti idrofobici che attraversano la membrana e dopo ciascun segmento vi è una regione "nucleotide-binding fold" (NBF) che lega l'ATP. La posizione della delezione di aminoacido, causata dalla delezione di tre coppie di basi, trovata più frequentemente in pazienti affetti da forma grave di CF, si trova nel primo (relativamente all'estremità aminica) NBF; questa è la mutazione DF508. La porzione centrale della molecola contiene siti che possono essere fosforilati dagli enzimi protein-chinasi A e protein-chinasi C.

con una componente citoplasmatica dotata dei siti che legano la protein chinasi C che ha il compito di regolare il trasporto di cloro. La proteina nel dominio che lega l'ATP (NBF) fa sì che il trasporto del cloro sia alterato e così influenza il sodio. Non viene più trasportata l'acqua e quindi i secreti delle ghiandole esocrine saranno privi di acqua o con un minor contenuto di acqua che rende il secreto più denso, più ricco di muco a livello dei polmoni. Il secreto ipo-mobile comporta un ristagno del muco polmonare che non viene ispettorato e diventa fonte di occlusione bronchiale ma anche la sede di inizio di infiammazioni e polmoniti perché qui rimangono bloccati i patogeni.

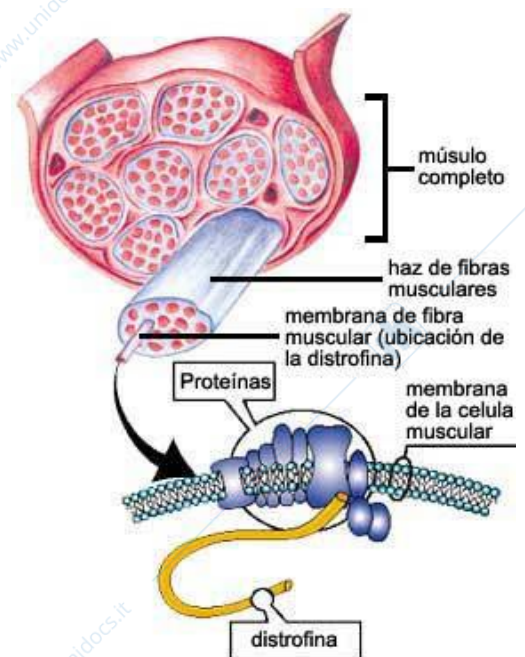
La malattia può essere letale entro i 30 anni se non viene trattata, il problema più grosso è il muco nei polmoni che viene tolto in modo meccanico con il drenaggio bronchiale e la somministrazione di antibiotici. Il nome deriva dal problema al pancreas esocrino che produce succhi pancreatici densi che persistono nel pancreas e lo digeriscono. Il danno si ripercuote sul riparo con produzione e deposito di collagene.

L'ultima terapia prende in considerazione degli adenovirus *ex vivo* per introdurre gene CFRT nelle cellule polmonari attraverso l'aerosol, purtroppo la proteina viene prodotta per poco tempo perciò oggi si sta sviluppando una ricerca con le cellule staminali che siano spinte a differenziarsi ripopolando il polmone.

Malattie sessuali recessive

Questa malattia può derivare da un maschio ammalato che si incrocia con una femmina sana (le femmine sono raramente sintomatiche), avremo il 100% delle figlie femmine portatrici sane e il 100% dei maschi sani. Il maschio malato trasmette la patologia a tutte le sue figlie e queste trasmettono al 50% dei loro figli maschi. Alcune di queste sono:

- Daltonismo;
- Carenza di fruttosio 6-fosfato-deidrogenasi;
- Emofilia A (1:10'000) e B (1:70'000);
- Agammaglobulinemia di Bruton;
- Malattia granulomatosi cronica, in cui manca il sistema NAD-ossidasi nei granulociti;
- Sindrome di Wiskott-Aldrich che porta ad immunodeficienza;
- Distrofica muscolare di Duchenne in cui abbiamo mutato il gene della distrofina. Questo gene è costituito da 79 esoni, 8 promotori tessuto specifico e 2,4 Mbasi. Il gene richiede 16 ore per essere completamente trascritto, è un gene enorme.



La proteina è necessaria per mantenere l'integrità del sarcolemma, si trova in corrispondenza di esso e contorna tutte le fibre muscolari che abbiamo (coinvolge una variazione di quantità o posizione della distrofina) in questo tipo di distrofia la proteina è del tutto assente, perciò il sarcolemma si lacera durante la contrazione.

Il fatto che ci impieghi così tanto è un ostacolo alla terapia genica, inoltre il tessuto bersaglio è molto diffuso e la produzione continua. La proteina iniettata nelle cellule muscolari funziona, ma non abbiamo un virus capace di contenere un gene così grande.

La malattia si manifesta con disturbi nella deambulazione: a 4-5 anni il soggetto ha difficoltà a correre, salire le scale ed alzarsi, a 12 gli risulta impossibile camminare, a 20-30 anni bisogna ricorrere all'assistenza meccanica per respirare in quanto il soggetto presenta insufficienza respiratoria, disturbo di conduzione cardiaca, fibrosi vasale, insufficienza cardiaca e deficit intellettivo. Si cercano di curare con corticosteroidi che rallentano l'evoluzione patologica, oggi si sta sviluppando una mini-distrofia per oltrepassare il problema della dimensione genica.

Anomalie citogenetiche

Sono dette anche anomalie cromosomiche, vengono studiate dalla citogenetica. Parecchi nati vivi (circa 5-7 su 1000 nati) sono portatori di almeno un'aberrazione cromosomica strutturale o numerica che però non danno nessuna alterazione fenotipica.

Sono aberrazioni bilanciate, non associate ad alterazioni cliniche evidenti infatti spesso non vengono diagnosticate. Alcune anomalie cromosomiche invece sono incompatibili con la vita, **anomalie di struttura** sono:

- **Traslocazioni**: scambio di frammenti di cromatidi durante la prima divisione meiotica oppure nei tumori come il linfoma di Burkitt, t(8, 14).
- **Delezioni**: perdita del materiale genetico, come ad esempio nel cromosoma 13 che porta via la proteina Rb oncosoppressiva del retinoblastoma.
- **Isocromosomi**: si ritrovano nella sindrome di Turner che ha un isocromosoma X, ovvero ha solo i bracci lunghi di questo cromosoma.
- **Inversioni**: due rotture del cromosoma, giro di 180° e ricongiungimento.
- **Duplicazioni** del segmento del cromosoma.

Una cellula si dice euploide quando ha un numero normale di cromosomi, aploide quando ne ha solo la metà (gameti), poliploide quando invece si parla di tumori in cui abbiamo una cellula con più di un nucleo e quindi più di un corredo cromosomico. Solitamente la poliploidia non è compatibile con la vita.

Le **aberrazioni numeriche** dei cromosomi sono solitamente incompatibili con la vita tranne la trisomia del 21 (Sindrome di Down), trisomia 18 (Sindrome di Edward) e trisomia 13 (Sindrome di Patau). Le ultime due portano solitamente a morte nel primo anno di vita. Queste trisomie derivano dalla mancata disgiunzione dei cromosomi durante la meiosi, fase di formazione dell'ovulo materno che si mantiene due cromosomi 21. Il 21 è il più piccolo dei cromosomi, questo spiega perché è compatibile con la vita.

La sindrome di Down dipende dall'età della madre: sopra i 30 anni l'incidenza è di 1:3000, sopra i 35-40 arriva a 1:300 e sopra i 45 arriviamo a 1:30. La trisomia 21 si manifesta con malformazione cardiaca perciò si interviene nei primi mesi di vita. Abbiamo inoltre problemi di ritardo mentale, difficoltà di apprendimento, ipotonia muscolare, macroglossia (lingua più grossa del comune), ma anche un aumento di rischio di leucemia e malattia di Alzheimer con placche senili all'inizio della mezza età. Ciò non stupisce perché il cromosoma 21 è proprio quello che sintetizza la SAP (sieroamiloide) che viene metabolizzata male e va a formare le placche di β -amiloide tipiche dell'Alzheimer. Questa proteina viene prodotta alterata ed in quantità maggiore.

Altre anomalie citogenetiche sono legate ai cromosomi sessuali:

- Sindrome di Turner il cui cariotipo è 45, X0 (=un X normale ed uno come isocromosoma): Si presenta su persone di sesso femminile che non producono sufficienti livelli di estrogeni che portano agenesia ovarica, abbiamo sterilità, statura è bassa, scarso sviluppo del seno, non

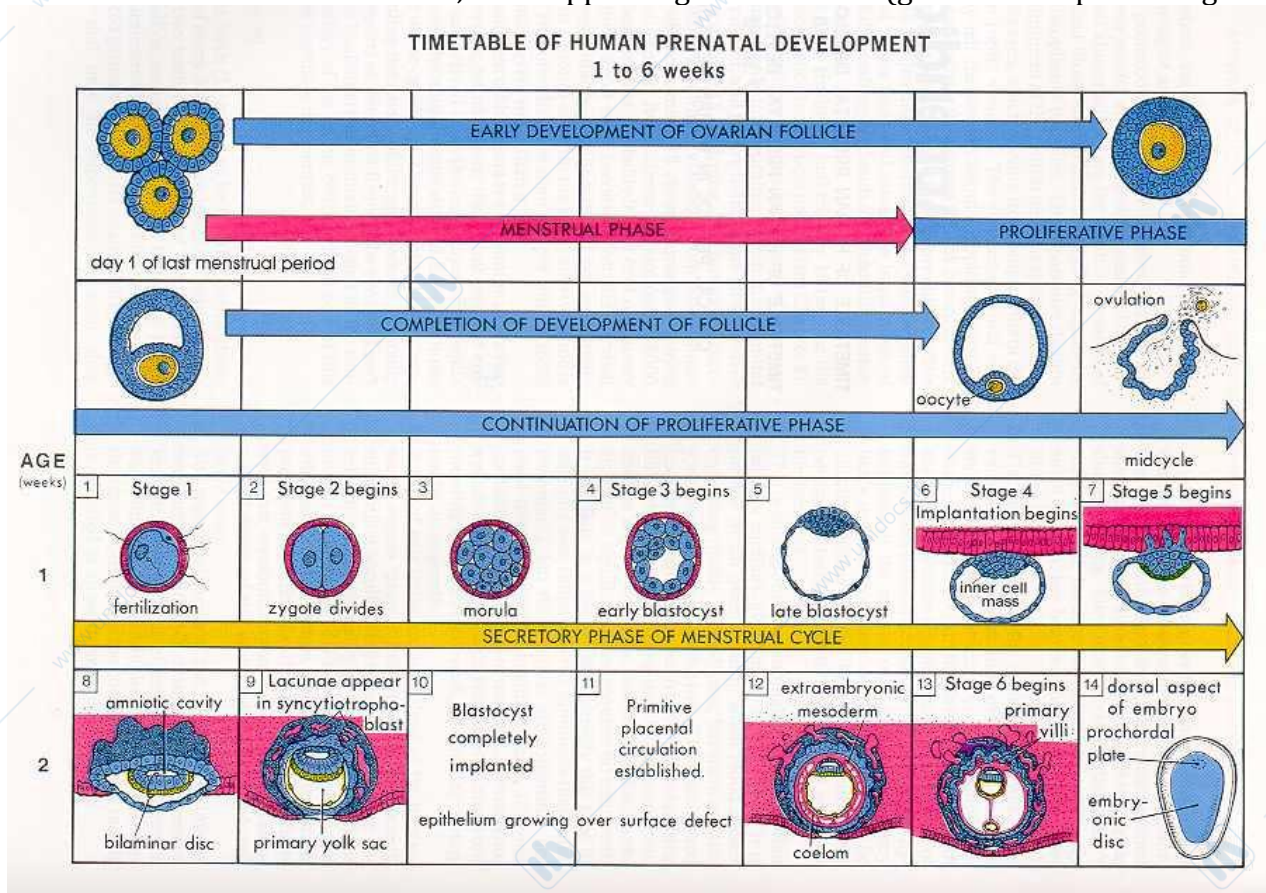
arriva la prima mestruazione (non c'è ovulazione) e ci sono problemi all'aorta ma lo sviluppo psichico è normale.

- **Sindrome di Klinefelter** (fenotipo 47, alterazione XXY) si manifesta nei maschi. I soggetti presentano un fenotipo normale fino alla pubertà, testicoli non ben sviluppati, basso livello di testosterone, seno leggermente ingrossato, sono sterili ma non impotenti e sono alti. Assolutamente normali dal punto di vista intellettuale.

Errori di morfogenesi

Si parla di errori di morfogenesi (ovvero nella formazione di un feto) in tutti i processi di embriogenesi, le prime 3 settimane dopo la fecondazione. Si parla anche di embrio- o feto-patie. La scienza che si occupa di queste si chiama teratologia: i teratogeni sono le sostanze chimiche o biologiche che creano queste anomalie. Le alterazioni non colpiscono le cellule germinali, quindi normalmente non vengono trasmesse, non sono ereditarie perché colpiscono un feto già concepito. I teratogeni portano a malformazioni, danni funzionali, ritardi nella crescita oppure possono causare aborto spontaneo a seconda dello stadio di gestazione.

Quando il teratogeno colpisce le cellule embrionali, parliamo di morte embrionale: lo zigote non si è ancora impiantato in utero, siamo all'8°-10° giorno dalla fecondazione. Se il danno avviene in pre-impianto, la morte è embrionale e avviene nelle prime due settimane dalla fecondazione. Se invece ci sono danni non letali, si sviluppano i gemelli siamesi (gemelli uniti per un organo).



Le malformazioni vere e proprie sono quelle che colpiscono il feto nelle prime 12 settimane di gravidanza, ovvero nel periodo in cui avviene l'organogenesi.

Da un punto di vista tecnico, le malformazioni sono:

- **Agenesia**, ovvero mancanza completa di un organo primario.
- **Aplasia**, se il rudimento dell'organo c'è ma non si è sviluppato.
- **Ipoplasia**, se l'organo si è sviluppato poco.

- **Anomalie disrafiche**, mancata fusione di strutture opposte che possono portare all'encefalia, al meningocele o alla spina bifida. Le meningocele avvengono quando le meningi o la parte finale della colonna vertebrale sporgono. Sono dolorose, impediscono i movimenti e si espone il tessuto cerebrale.

Ci sono una serie di **teratogeni non infettivi**, come droghe, cocaina e alcol ma anche diabete mellito, lupus sistemico eritematoso e farmaci. Non è né etico né facile fare i test in gravidanza, lo si fa nei modelli animali che però a volte non sono predittivi.

Agenti teratogeni di tipo infettivo sono il complesso di TORCH(= Toxoplasmosi, Rosolia, Citomegalovirus, Herpes Virus), la sifilide e il virus Varicella Zoster. Possiamo avere microcefalia, calcificazioni paraventricolari all'SNC, ritardo mentale, colesterasi neonatale, cardiopatie, epatomegalia, ittero, petecchie o porpora.

La diagnosi prenatale si fa attraverso diversi metodi:

- Ecografia: oltre a dirci l'età gestazionale e se ci sono gravidanze multiple, controlla la crescita fetale e distretti anatomici;
- Screening materno di AFP, b-hCG e estriolo non coniugato identificano il 60% dei casi di sindrome di Down;
- Spessore(translucenza) della plica nucale, identifica circa l'80% dei feti con anomalie cromosomiche;
- Prelievo dei villi corali(o villocentesi), ci permette di evidenziare la presenza di malattie mendeliane come sordità congenica, distrofia muscolare di Duchenne o emoglobinopatie.
- Amniocentesi, solitamente nelle donne di età superiore ai 35 anni;
- Prelievo di sangue dal cordone ombelicale(percutaneo), ci permette di sequenziare il DNA fetale;
- Biopsie fetali, per intervenire chirurgicamente nel feto;
- Tecniche biomolecolari.

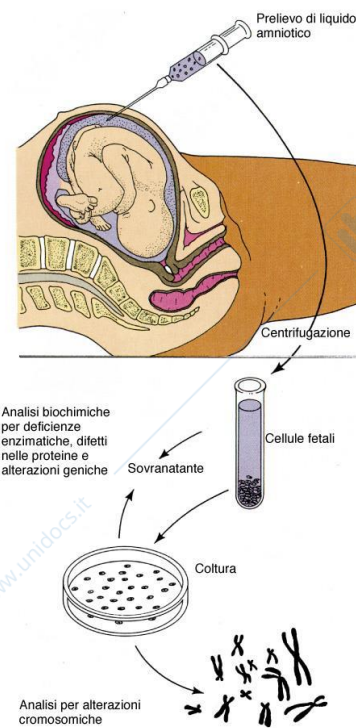
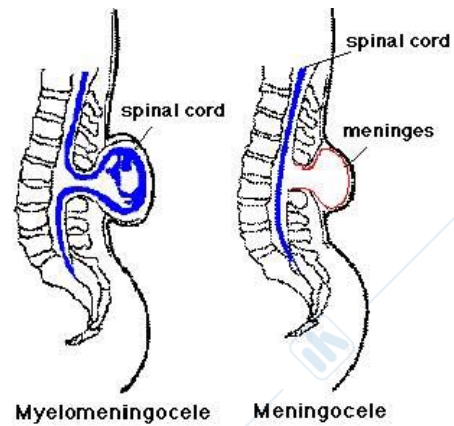


FIGURA 7-1. Passaggi nell'amniocentesi, una procedura utilizzata per la diagnosi prenatale dei difetti genetici.

PATOLOGIE DELLA TIROIDE

La tiroide si trova nel collo, davanti alla laringe. Tende ad ingrossare in patologie dando il gozzo. E' formata da due lobi uniti da una porzione centrale. All'interno abbiamo una struttura follicolare in cui lo spazio vuoto è ripieno di colloide che contiene la tireoglobulina e gli ormoni tiroidei prodotti dai tireociti. Le cellule C e le cellule parafollicolari sono adibite alla secrezione della calcitonina che partecipa al metabolismo osseo. La secrezione degli ormoni tiroidei è governata dal asse ipotalamico-ipofisario che colpisce la tiroide ma anche le gonadi, il surrene e tutte le cellule endocrine. Gli assi endocrini si regolano con una secrezione a tre steps:

1. A livello ipotalamico che rilascia un fattore stimolante l'ipofisi,
2. Nell'ipofisi che a sua volta rilascia ormoni verso la ghiandola;
3. A livello della tiroide.

Il controllo è estremamente rigido e importante: l'ipotalamo rilascia TRH (tireotropina), che giunto all'ipofisi permette di produrre TSH (ormone tiro-stimolante) che a sua volta agisce sulla tiroide, gli comanda di rilasciare ormoni in circolo, tri iodio-tironina (T3) e tetra iodio-tironina (T4).

Il meccanismo di controllo a feedback negativo serve a mantenere sotto controllo tutti gli assi endocrini: l'ipotalamo comanda all'ipofisi che comanda alla tiroide di rilasciare ormoni, ma quando questi ormoni sono in circolo inibiscono l'ipotalamo bloccando la produzione di ulteriori ormoni. Il fatto che esista un meccanismo di controllo così importante mi permette di dosare gli ormoni rilasciati dalla tiroide e il TSH, il rapporto tra i due mi aiuta a diagnosticare le differenti patologie. Se il sistema funziona mi aspetto che non ci sia ulteriore TSH, ogni volta che T3 e T4 sono bassi lo stimolo alla tiroide stessa è elevato e quindi la ghiandola lavora. Se i rapporti fisiologici non sono mantenuti, capisce se il danno sta a livello ipotalamico, ipofisario o della ghiandola endocrina.

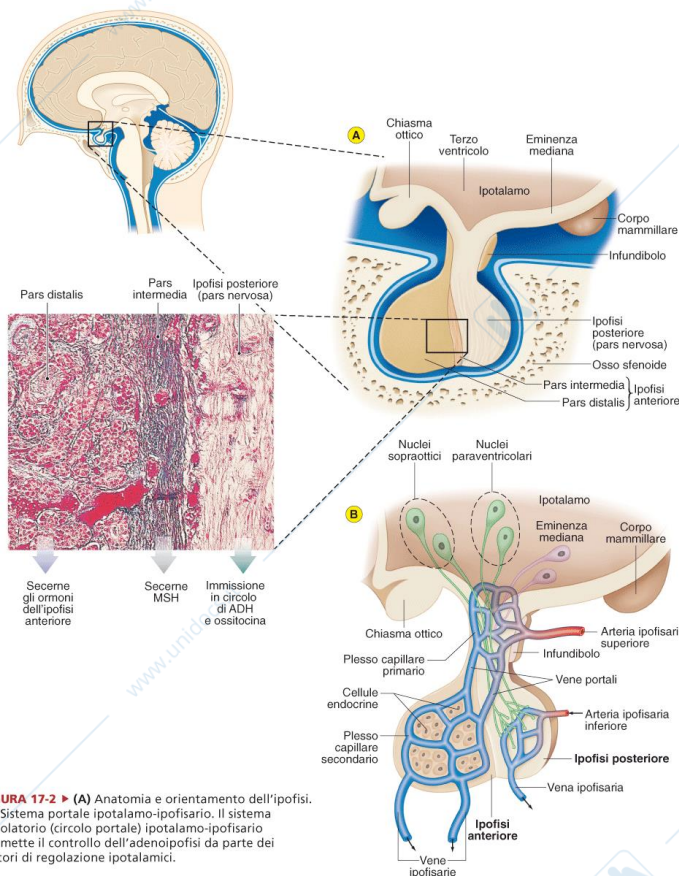
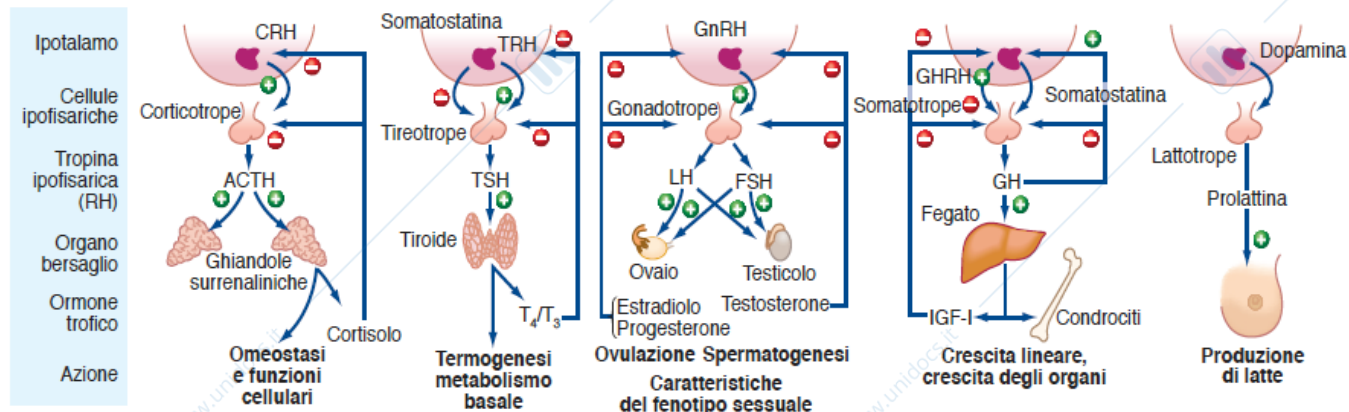


FIGURA 17-2 ▶ (A) Anatomia e orientamento dell'ipofisi. (B) Sistema portale ipotalamo-ipofisario. Il sistema circolatorio (circolo portale) ipotalamo-ipofisario permette il controllo dell'adenipofisi da parte dei fattori di regolazione ipotalamici.



Biosintesi degli ormoni tiroidei

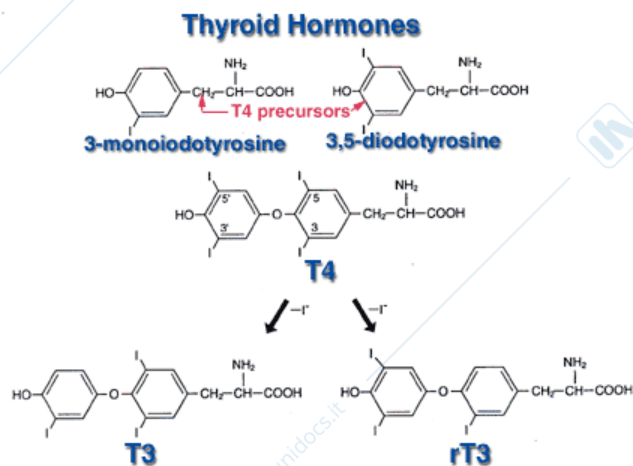
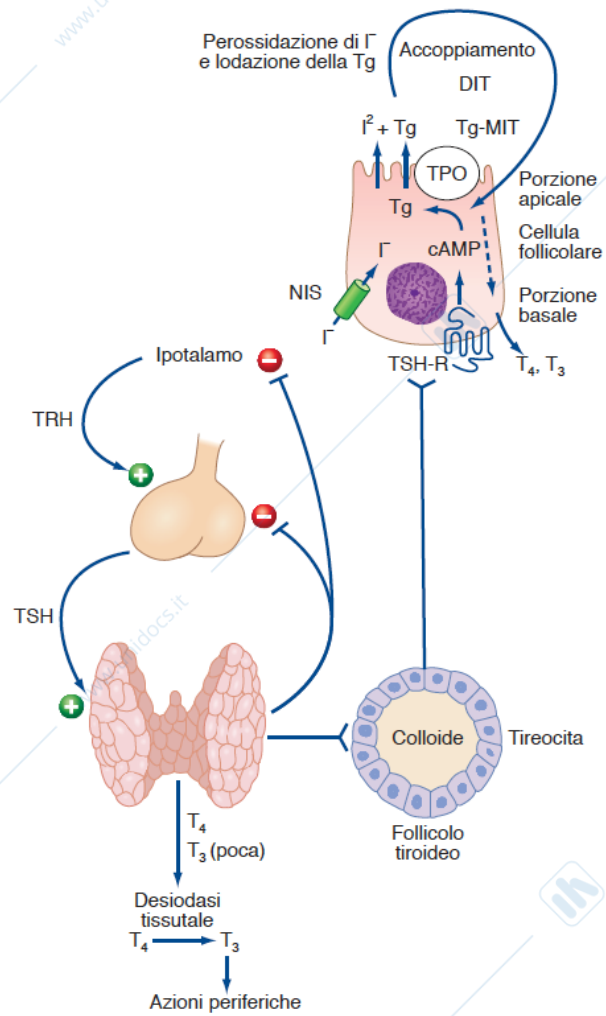
Gli ormoni tiroidei sono dipendenti dallo iodio che viene captato dai tiroцити. Lo iodio entra nella cellula tiroidea follicolare con un simporto sodio-iodio accoppiato ad una pompa ATP-dipendente, solitamente la pompa sodio-potassio. Lo iodio viene metabolizzato nella cellula: la prima reazione è l'ossidazione, l'enzima coinvolto è la tiroide-perossidasi (TPO). Questo è il target anticorpale nelle malattie autoimmuni. Serve per bloccare lo iodio all'interno della cellula follicolare. Inoltre, è necessaria la tirosina a cui si attaccano più di un atomo di iodio formando la monoiodo-tirosina (MIT) e la diiodo-tirosina (DIT). Lo step finale è la condensazione dei due precursori ormonali, due molecole di DIT mi danno la T4 mentre mettendo insieme una MIT e una DIT ottengo la T3.

T3 e T4 sono entrambi ormoni finiti e dosabili, ma differiscono fortemente per la quantità con cui vengono emesse: viene liberata una quantità maggiore T4. L'ormone T3 è però l'ormone che deve interagire a livello recettoriale. A formazione della T3 avviene in periferia per opera di un enzima capace di staccare atomi di iodio: la desiodasi tissutale.

La seconda via che può attivarsi è sempre la trasformazione da T4 e T3 ma anziché perdere un atomo di iodio sull'anello interno lo perdo sull'anello esterno, quindi ottengo la revers-T3 che è totalmente inattiva. L'enzima che agisce è sempre la desiodasi, ma la rT3 è in forma inattiva. Questa forma inattiva si trova con eventi che non hanno a che fare con le patologie tiroidee: malattie infettive, infarto, embolo polmonare, ustioni o traumi dovuti a interventi chirurgici. Questa è detta "sindrome dal malato eutiroideo": in questi casi T4 e TSH sono normali dagli esami diagnostici ma le funzionalità ormonali sono alterate. Il paziente si riprende dopo poco tempo.

Gli ormoni tiroidei devono essere legati a proteine per essere trasportati: sono legati per il 99% a sieroglobuline. La proteina che più di tutte partecipa a legarsi è la TBG (*tiroid binding protein*) ma partecipano anche la transtiretina e l'albumina. La forma attiva è la forma libera, non quella legata. E' importante che venga liberata: le quantità di fT3 e fT4 (f sta per *free*) normali sono rispettivamente di 0,4 e 2 ng/dl.

L'assunzione di pillola contraccettiva o la gravidanza portano un aumento dei valori di T3 e T4. Durante questi periodi abbiamo ipertiroidismo apparente perché spesso il medico dosa T3 e T4 totali.



Gli ormoni tiroidei hanno effetti pleiotropici, ovvero hanno la capacità di agire su praticamente quasi tutti gli organi, hanno recettori ovunque:

- ❖ Hanno azione importante sul cuore: l'effetto fisiologico degli ormoni tiroidei aumenta la sintesi di catecolamine e quindi si ha un effetto inotropico e ionotropico positivo che aumenta la gittata, la ventilazione e la frequenza cardiaca
- ❖ Sul SNC, gli ormoni tiroidei sono essenziali per il corretto sviluppo neonatale.
- ❖ Partecipano, insieme ad altri ormoni come il GH, alla maturazione dello scheletro.
- ❖ Hanno azione fondamentale sul metabolismo lipidico, proteico e glucidico: il nostro metabolismo funziona troppo.
- ❖ Inoltre, porta al disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale che porta alla produzione di calore (azione termogenica) ed all'aumento della sudorazione.

I recettori tiroidei sono definiti intracellulari, gli ormoni entrano nelle cellule bersaglio, trovano questi recettori, si legano, dimerizzano ed entrano nel nucleo. Funzionano da fattori di trascrizione, come tutti gli ormoni steroidei.

Sintomi

I sintomi della patologia tiroidea: abbiamo due situazioni opposte, la tiroide da un eccesso o un difetto di produzione degli ormoni T3 e T4. Sintomi locali sono il **gozzo** con occasionale dolore, compressione o infiltrazione (tumori) sulle strutture adiacenti. Alcune patologie della tiroide si possono riconoscere facilmente perché hanno sintomi caratteristici come il **morbo di Graves-Basedow** che porta alla oculopatia infiltrativa, all'esoftalmo o a dermatopatia infiltrativa.

Gozzo

Il gozzo è un ingrossamento della tiroide, diffuso o nodulare. La ghiandola è più o meno ingrossata ed è più probabile che il nodulo tiroideo sia benigno piuttosto che maligno. Ovviamente, l'ingrandimento è di dimensioni variabili. Il gozzo non ci dice che tipo di disfunzione tiroidea è presente, iper- o ipotiroidismo non sono correlati direttamente all'ipofisi. Quando ho un ipertiroidismo, si cerca di produrre più TSH per compensare la produzione di T3 e T4 mentre nell'ipotiroidismo si ha un'iperproduzione di T3 e T4.

Esami di laboratorio

I test diagnostici si fanno dosando gli ormoni e il relativo fattore di controllo.

Uno dei problemi maggiori nella valutazione della patologia tiroidea è che non si aveva un test sufficiente sensibile, oggi siamo in grado di farlo con il test del TSH supersensibile.

In seguito, doso T3 e T4 totali e nelle frazioni libere così da avere un quadro generale e veritiero. La tiroide è una sede di malattie autoimmuni, le donne hanno una maggior probabilità 10:1 rispetto agli uomini a contrarre patologie tiroidee autoimmuni.

Si può fare anche la scintigrafia tiroidea, è uno degli esami di routine:

Assumo un isotopo radioattivo che la ghiandola accumula, una volta si usava un isotopo radiattivo dello iodio che era difficile da smaltire, ci metteva 6 ore e più, bisognava isolare il paziente, tenerlo lontano dai bambini. Si usa il ^{123}I che ha emivita di 12-13 ore.

Oggi si usa il pertecnetato $^{99\text{m}}\text{Tc}$ che ha un'emivita più corta di circa 6 ore e da minori danni.

In funzione di quanto isotopo radioattivo viene captato dalla tiroide, vedo come funziona la tiroide. Si può anche fare una ecografia o un'ago aspirato e/o biopsia: prelevo un po' di tessuto, lo striscio su un vetrino e lo analizzo.

Ipertiroidismo

L'ipertiroidismo è un'iperfunzione della ghiandola tiroidea, diverso dalla tireotossicosi che è la situazione clinica che deriva dall'esposizione ad eccessive quantità di ormoni tiroidei. Questo avviene ad esempio quando le ovaie si mettono a produrre un ormone tiroideo, struma ovarica.

Le manifestazioni cliniche sono variabili e dipendono dall'età del paziente e dalla durata dell'ipertiroidismo. Spesso i pazienti anziani hanno ipotiroidismo. La patologia colpisce di più le donne.

Il soggetto colpito è irritabile, nervoso, affaticabile e presenta deficit di concentrazione può avere aritmie e fibrillazione atriale. Il soggetto mangia molto ma non ingrassa, perde peso velocemente. Ha debolezza e dolore muscolare diffusa, termogenesi aumentata e può presentare il fine tremore.

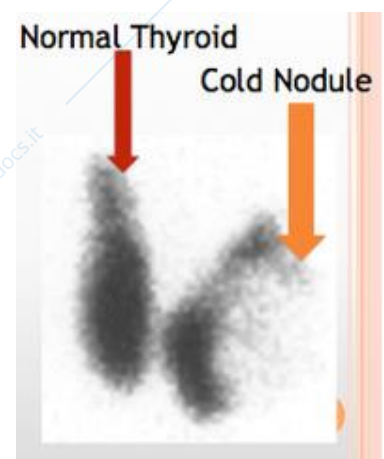
Il morbo di Graves-Basedow

È una patologia su base autoimmune che coinvolge il sistema HLA-DR3, deve avere una predisposizione genetica a sviluppare malattie autoimmuni della tiroide. Questa patologia produce ipertiroidismo, è una delle patologie su base autoimmune più comuni. Essa porta alla formazione di anticorpi diretti contro il recettore del TSH, si ha produzione di anticorpi che riconoscono qualcosa di *self* lo legano e lo attivano. Nel soggetto con questo morbo gli anticorpi TSI (Ig tireo-stimolanti) agiscono come il TSH portando a produrre T3 e T4. Normalmente, se ho una grande produzione di T3 e T4 la produzione di TSH è inibita mentre nel caso del morbo, non si ha feedback negativo perché il TSH non ha più controllo esclusivo, agisce anche TSI.

Nel ipertiroidismo si ha una minore lassità dei muscoli tiroidei che espone l'occhio, nel morbo inoltre si ha il deposito di gluco-polisaccaridi nel retro della cavità oculare che spinge l'occhio in fuori. Inoltre, possiamo avere mixedema localizzato solitamente a livello della regione pretibiale: abbiamo delle protuberanze di materiale debolmente resistente alla pressione che è un composto di glicosaminoglicani sottocutanei.

Un altro motivo per cui si diventa ipertiroidei è la presenza di un nodulo o adenoma che è un'anomala formazione di tipo proliferativo nel tessuto tiroideo, i noduli vengono riconosciuti al tatto. Il resto del tessuto rimane normale, solitamente sono noduli benigni. Si distinguono con la scintigrafia della tiroide: definisco il nodulo freddo quando la tiroide non è captante, definisco il nodulo caldo quello della tiroide iperfunzionante (la zona captante è di colore nero) e solitamente sono adenomi benigni. Nel caso di un adenoma tossico (caldo) abbiamo adenomi captanti più del normale, solitamente sono adenomi follicolari che subiscono una mutazione somatica attivante R per TSH. L'attività dell'adenoma è autonoma e provoca una soppressione del rimanente parenchima tiroideo.

La patologia si presenta solitamente intorno ai 30-40 anni, ha normalmente base genetica ma può essere scatenata da fattori infettivi (*E. Coli*, *Yersinia* e molti gram-) ed emozionali. Le manifestazioni cliniche sono in genere più lievi di quelle del gozzo tossico multinodulare.



Ipotiroidismo neonatale

Questa patologia ha sintomi come debolezza (dovuta ad ipometabolismo), rallentamento dei movimenti, ridotta attenzione, intolleranza al freddo, bradicardia, scarso appetito, ridotta sudorazione, mixedema e secchezza di pelle e capelli (con perdita).

L'ipotiroidismo si associa spesso alla presenza di gozzo endemico e cretinismo neonatale. Ci sono regioni del mondo in cui lo iodio è estremamente scarso, in queste aree la patologia è endemica. In queste regioni c'è supplementazione di iodio nella dieta attraverso l'acqua, pesce, latte e uova.

Oggi è obbligatorio mettere a disposizione il sale iodato insieme al sale normale. Lo iodio è essenziale nelle fasi finali della vita gestazionale e nei primi anni neonatale che richiede ormoni tiroidei, altrimenti si potrebbero avere deficit cognitivi che definiamo "cretinismo". Se una donna è eutiroidica (ma ha avuto iper- o ipo-tiroidismo durante la sua vita), durante la gravidanza lo sviluppo del feto non ha problemi ma dopo la nascita il bambino può presentare la patologia

quindi deve assumere subito ormoni tiroidei. Non succede sempre ma il bambino è molto a rischio, per questo è stato introdotto al terzo giorno di vita un controllo del sangue sul TSH.

MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Sono patologie che comportano la perdita di selettive popolazioni neuronali più o meno distribuite nel nostro sistema nervoso. Le patologie che ne derivano danno sintomi più o meno gravi. I neuroni sono cellule non in grado di riprodursi che quindi se perdiamo, non siamo più capaci di recuperare. Possono compensare la perdita di alcuni neuroni sviluppando funzionalità in quelli rimasti, ma ciò non è possibile per le patologie neurodegenerative perché non conosciamo la causa che le scatena. Solitamente si muore per gli sviluppi della patologia, non per la patologia stessa.

Il danno originale è comune, le patologie differiscono per il modo in cui le cellule neuronali muoiono in quanto le cause sono molto diverse.

Spesso le patologie neurodegenerative hanno base ereditaria, possono:

- Presentare un gene mutato, come nella corea di Huntington.
- Avere una "gain of function" o una "loss of function".

Il problema fondamentale è che quasi tutte le patologie che conosciamo hanno forme ereditarie, ma per la maggior parte sporadiche. Per alcuni versi le patologie assomigliano ai casi geneticamente determinati ma non conosciamo i meccanismi alla base della morte del neurone:

- Aggregazione proteica, ovvero un processo metabolico che è fisiologicamente fondamentale per il neurone per sopravvivere. Queste proteine diventano dannose perché si depositano come complessi proteici. LA PROTEINA E' INSOLUBILE E QUINDI INELIMINABILE!
- Autofagia, apoptosi che è fatta per proteggere il neurone. Il meccanismo autofagico si attiva in una condizione per funzionare il meno possibile quando la cellula non ha bisogno di qualcosa e si atrofizza. Quando troppi neuroni vanno incontro a questo processo, il meccanismo di difesa diventa dannoso.

Le patologie neurodegenerative colpiscono normalmente i pazienti sopra i 65 anni di età, sono croniche e progressive e portano alla perdita simmetrica e selettiva di una specifica popolazione neuronale. La loro eziologia e patogenesi non è ancora del tutto chiara.

Tutte le malattie neurodegenerative si dividono sulla base dell'area cerebrale prevalentemente coinvolta:

- Corteccia: demenza di Alzheimer, di Pick e le malattie da prioni (mucca pazza);
- Sistema extrapiramidale: morbo di Parkinson;
- Motoneuroni: SLA (sclerosi laterale amiotrofica);
- Da triplette. Coinvolgono tante regioni diverse in cui abbiamo un'anomalia genetica di una tripletta ripetuta molte volte;
- Demielinizzanti: sia nell'SNC che nel SNP come la sclerosi multipla.

Malattia di Alzheimer

Costituisce la causa principale di demenza nelle popolazioni industrializzate, causa l'80% dei casi. Si manifesta tra i 70-90 anni di età ma ci sono anche forme di Alzheimer precoci che sono geneticamente determinate. Queste sono fondamentali per capire quali proteine sono importanti per far funzionare bene i neuroni corticali. Due sono le caratteristiche essenziali dell'Alzheimer:

- ✓ Placche senili β -amiloidi,
- ✓ Grovigli neurofibrillari di citoscheletro, in particolare proteine τ .

Questa patologia ha un'importante correlazione con la sindrome di Down (trisomia 21) perché chi ha questa sindrome presenta Alzheimer intorno ai 40 anni: si è visto che il gene che codifica per la proteina nell'Alzheimer si trova sul cromosoma 21 e la proteina che ne deriva (la β -amiloido) si produce fisiologicamente. Quando la patologia si sviluppa, ne viene prodotta troppa o viene metabolizzata male.

L'Alzheimer è una malattia della corteccia. C'è una perdita progressiva dei neuroni con una settorialità: inizialmente sul lobo temporale e frontale, poi parietale e infine nei nuclei della base di Meynert, amigdala e ippocampo. L'iniziale disfunzione è colinergica, diminuisce il numero di neuroni colinergici, la sintesi di acetilcolina e i recettori colinergici. La malattia viene sottolineata con importanti deficit di memoria, che col passare degli anni si associa a disturbi di altra natura. La disfunzione degenerativa nel tempo coinvolge anche i neuroni serotoninergici e noradrenergici.

Le cure ad oggi sono palliative, si tenta di potenziare la trasmissione colinergica a livello farmaceutico ma sono solo un tentativo di rallentare l'evoluzione della patologia, non funzionano più quando il sistema colinergico è completamente distrutto.

Diagnosi

Per diagnosticare la patologia si vanno a cercare le placche di β -amiloide e le i grovigli neurofibrillari di proteina τ . Inoltre si può fare un'analisi macroscopica: facendo la TAC o la risonanza magnetica si evidenzia una marcata atrofia della corteccia cerebrale e un ampliamento dei ventricoli laterali. Spesso questo non si fa a causa dell'età del paziente, inoltre queste due caratteristiche che vengono definite diagnostiche dell'Alzheimer in realtà sono presenti nella maggior parte dei pazienti che hanno più di 70 anni.

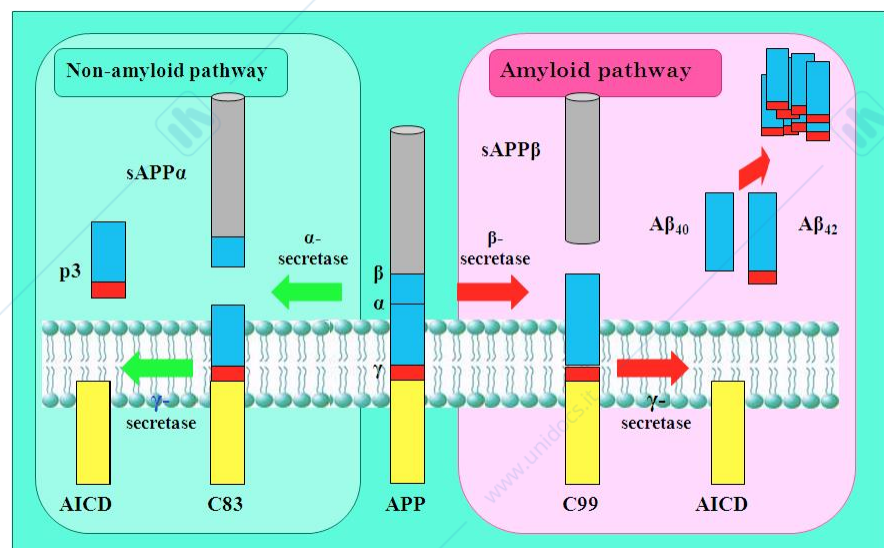
Non si possono fare analisi certe di Alzheimer sul paziente perché bisognerebbe analizzare il cervello, si possono fare dei test che stabiliscono quale è lo stato di deficit cerebrale del paziente. Si deve fare a sei mesi di distanza per vedere quanto la patologia è degenerata. I test in realtà servono più a livello statistico che come dati di laboratorio.

Le placche di β -amiloide sono formate da materiale proteico disposto a β -foglietto indigeribile che si deposita tra una cellula e l'altra, sono delle amilosi. Le placche stabilizzano i neuroni, fanno in modo che non interagiscano e quindi i neuroni perdono la loro attività tropica, morendo. Per questo intorno a queste placche troviamo neuroni morti e macrofagi intervenuti.

I grovigli di proteina τ sono degli accumuli della proteina tubulina che si polimerizza per stabilizzare i microtubuli, ma deve essere fosforilata. Abbiamo una forma iperfosforilata che non permette più ai microtubuli di svolgere la loro funzione: vengono destabilizzati microtubuli e citoscheletro. Il neurone necessita che il citoscheletro sia integro e quindi va incontro a neurodegenerazione. Non si sa perché la proteina τ si aggrovigli.

La β -amiloide che precipita nel malato di Alzheimer è un frammento β -proteico di 39-42AA ottenuto per scissione proteolitica di un precursore sul cromosoma 21, il gene APP. Questo precursore è una proteina transmembrana ancorata al neurone che subisce un processamento fisiologico, ovvero solitamente dà un frammento digeribile. Nella malattia c'è un processamento anomalo della proteina. Ha un ruolo di stabilità della membrana.

Il precursore quando viene normalmente processato dalla α -secretasi viene scisso in due pezzi: uno rimane ancorato alla membrana, mentre l'altro è un frammento extracellulare idrosolubile (sAPP). Poi entra in gioco la γ -secretasi che processa il segmento ancorato alla membrana. Quando si ha l'insorgenza della patologia, si suppone che il primo enzima che



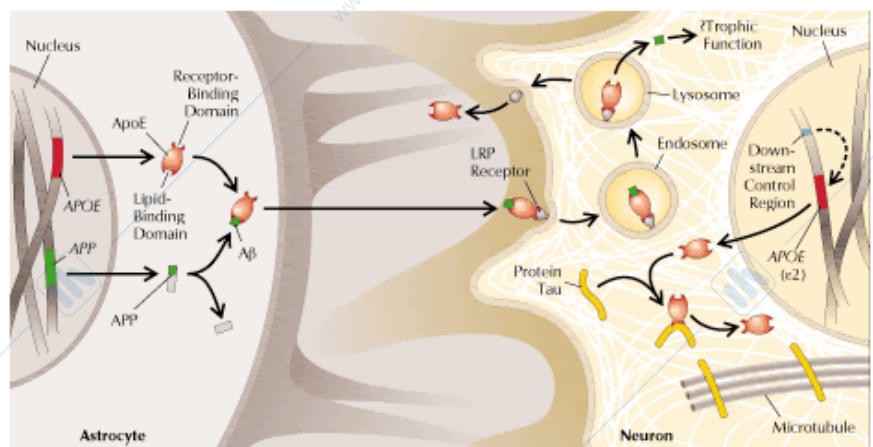
processa il precursore sia la β -secretasi producendo un frammento idrolitico che ha un ruolo tossico, mentre il frammento ancorato alla membrana è più lungo del fisiologico e quando interviene al γ -secretasi forma un frammento di 2-3AA più lungo del fisiologico. Il fatto che sia più lungo permette a questo frammento di cambiare conformazione: sarebbe stato normalmente ad α -elica e invece si pone in β -sheet e forma la struttura a palizzata che precipita tra un neurone e l'altro. Si dice che i due frammenti derivati da α - e β -secretasi sono sempre presenti, fino ai 70 anni circa utilizziamo prevalentemente la β -secretasi. Non sappiamo se l'utilizzo della β -secretasi sia dovuto ad un'alterazione genica o se sia fisiologico: se il rapporto è sempre a sfavore della β -amiloide, chi ha la trisomia 21 manifesta l'Alzheimer prima perché l'accumulo c'è sempre ma loro lo manifestano prima avendo un cromosoma 21 in più. Il rapporto fisiologico tra le due isoforme di secretasi è:
 $A\beta_{42} : A\beta_{40} = 1 : 10$.

I fattori di rischio sono sicuramente:

- **Età**, più la popolazione invecchia più ci sono casi di Alzheimer;
- **Sesso**: gli ormoni estrogeni fanno crescere bene i neuroni, la donna perciò è protetta fino alla menopausa. Si è proposta la terapia estrogenica sostitutiva, ma si è visto che questi non incidono nella patologia. Le donne hanno una prospettiva di vita più lunga degli uomini, quindi presentano più facilmente la patologia.
- **Famigliarità**: è una patologia che aggrega in famiglia, ovvero in diverse generazioni della stessa famiglia vedo più casi della stessa patologia. Si può ipotizzare che ci sia un'insorgenza genica.
- **Trisomia 21**
- **Abitudini di vita**: non ci sono dati scientifici statisticamente validi che ci diano un'evidenza certa su come alcol, fumo o dieta influenzino l'insorgenza di patologia. Invece, pare che l'alluminio presente in acque e alimenti sia nocivo per la patologia.

I casi genetici di Alzheimer sono sporadici per la maggior parte, ma qualche caso che ha un esordio particolare è di tipo genetico. Normalmente, questi casi si manifestano prima e per questi è stato individuato un gene. I casi geneticamente determinanti sono l'1-2% dell'intera popolazione che si ammala, ma sono molto importanti perché si è visto che in questi pazienti è mutato il gene della presenilina 1 e 2 (una subunità catalitica della γ -secretasi). Se conosco il gene mutato che mi dà la patologia e lo codifico, posso immaginare che anche nei casi sporadici questo gene sia mutato e quindi lavorare su di esso.

L'altra correlazione geneticamente modificata coinvolge la apolipoproteina E: si è scoperto che apoE è presente e codificata in 3 alleli $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. Questi danno 3 isoforme: apoE2(8%), apoE3(70-80%) e apoE4(14%). A livello neuronale, le apolipoproteine hanno un ruolo trofico, partecipano alla sopravvivenza del neurone e l'isoforma E4 sembra che sia implicata nella patologia. ApoE4 è prodotta nel fegato e nel cervello (astrociti e neuroni), favorisce il deposito di β -amiloide e lega la proteina τ . Si può prevenire la formazione di apoE4 mettendo in trattamento il paziente che lo presenta ancora prima che si manifesti la patologia. ApoE in generale è presente nelle placche di β -amiloide, ma non può essere usato come marcatore certo di patologia perché non siamo sicuri che sia predittivo.



L'Alzheimer è una malattia progressiva: inizia con un deficit di memoria fino ad arrivare ad una patologia psichiatrica.

Segni e sintomi della patologia sono, in successione temporale:

- Disturbi cognitivi legati alla memoria a breve termine;
- Disfunzioni di tipo linguistico, i pazienti non ricordano termini specifici;
- Deficit esecutivi. Ad esempio, non riconoscere la propria casa o non sentire il sintomo della sete\ fame;
- Sintomi psichiatrici: i soggetti affetti parlano con oggetti o vedono persone che non ci sono, hanno allucinazioni visive o uditive, forme maniacali e ansiolitiche.
- Depressione (è meglio che il paziente non sappia che ha la patologia, perché altrimenti si deprime), delusione, allucinazioni ed agitazione.
- Il paziente arriva a farsi del male, finché non diventa incapace di curarsi.
- Incapacità di svolgere attività basali come mangiare, bere, lavarsi e controllare bisogni fisiologici.
- Morte per deperimento organico lento e depressivo.

Malattia di Parkinson

È una malattia più precoce dell'Alzheimer, interessa tutte le etnie ed entrambi i sessi. È una disfunzione del sistema dopaminergico che controlla i movimenti fini e le capacità di coordinazione motoria. Il paziente non va incontro a paralisi, si ha un'alterata coordinazione dei movimenti. Alcune forme genetiche sono introno ai 35 anni. C'è la presenza di corpi di Lewy: aggregati che si depositano nel neurone e implicano la sua morte. Il deficit di dopamina è una caratteristica delle fasi iniziali, poi vengono coinvolti anche i neuroni vicini. Il ruolo dell'integrità del citoscheletro è tipico di tutte le malattie neuro-degenerative. La morte selettiva è quella dei neuroni della *substantia nigra* e del *locus coeruleus* che sono i neuroni dopaminergici pigmentati.

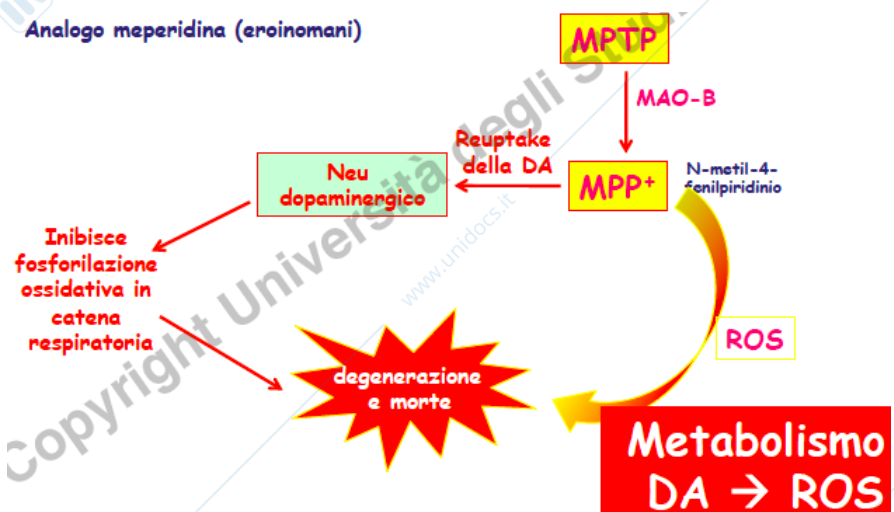
Non si sa quale sia l'eziopatogenesi del Parkinson, un fattore di rischio positivo che conosciamo è il fumo: fumare riduce della metà il rischio di contrarre la patologia. Probabilmente il Parkinson insorge per uno stress ossidativo, quindi assumere anti-ossidanti con la dieta potrebbe essere positivo. Inoltre, pare che tanti pesticidi ed erbicidi influiscano l'insorgenza della patologia.

Siccome gli erbicidi vengono utilizzati anche nel mantenimento dei campi da calcio, si presume che i calciatori sviluppino la patologia perché respirano pesticidi per anni.

L'unica ipotetica spiegazione di come insorga il Parkinson è l'esistenza di una sostanza ad azione neurotossica MPTP, usata per tagliare l'eroina. La sostanza viene processata dal neurone MAO-B dando il metilpiridinio (MPP⁺, reale composto tossico) che viene assunto come dopamina dal neurone dopaminergico in cui aumenta i radicali liberi dell'ossigeno, inibisce la fosforilazione ossidativa in catena respiratoria e lo stress ossidativo portando alla morte neuronale.

Alcuni geni modificati danno un'insorgenza di Parkinson, come avviene nell'Alzheimer.

Sintomi del morbo di Parkinson sono:



- Il tremore marcato a riposo e aggravato dalle emozioni: dapprima a uno o due arti e poi esteso a tutto il corpo fino al capo. La grafia cambia nel tempo, lo studio grafico è uno degli esami eseguiti dal neurologo per verificare quanto sia grave la patologia.
- La rigidità e bradicinesia: il paziente riduce i movimenti automatici e coordinati (cammina con le braccia rigide), inizia il movimento ma è rallentato e per bloccarlo bisogna porsi di fronte. Il volto è amimico (non coordinano i muscoli del viso), il linguaggio monotono e la voce è ipofonica. La deambulazione è a piccoli passi.

Trattamenti

Ad oggi, uno dei trattamenti più efficienti per questa patologia è la somministrazione di levodopa. L-dopa è un farmaco associato ad un inibitore periferico della dopa-decarbossilasi (carbidopa). Questo inibitore toglie di mezzo la dopamina e potenzia la capacità della dopamina esogena. È il trattamento più vecchio ma quello tutt'ora più efficace, i farmaci sviluppati in seguito sono potenziatori della trasmissione dopaminergica che hanno la stessa azione della L-dopamina che però ha un effetto on-off: quando io somministro L-dopa, questa ha un'emivita di un certo numero di ore, ma nella fase finale il paziente è scoperto e si ferma. I pazienti perdono il riflesso della nutrizione e di solito muoiono per paralisi respiratoria perché si perde il movimento diaframmatico.

La terapia con le cellule staminali è fattibile: in laboratorio si è riusciti a differenziarle in neuroni dopaminergici, si riesce anche ad inserire queste cellule nel cervello senza però rimuovere la causa di morte di questi neuroni dopaminergici originali. Con il tempo degenerano anche i neuroni dopaminergici reimpiantati. La terapia staminale non è quindi definitiva.

La sclerosi multipla (non la chiede)

È una malattia demielinizzante: gli assoni mielinizzati perdono la guaina mielinica e quindi la conduzione è rallentata. Esistono due tipi di cellule che fanno mielina: gli oligodendrociti a livello dell'SNC e le cellule di Schwann nell'SNP. L'oligodendrocita mielinizza tanti neuroni, mentre le cellule di Schwann ricoprono una sola parte dell'assone. Quando perdo mielina a livello centrale non rimielinizzo più, a livello periferico invece se ho un danno neuronale si rimielinizza.

La sclerosi multipla è una malattia autoimmune HLA associata, ha bisogno di un trigger immunologico: si nasce con la predisposizione genetica e durante la vita un'infezione o un danno emozionale/meccanico richiama i linfociti T_H1 e T_H17 che a loro volta richiamano citochine che attivano un ambiente infiammatorio che degradano specificamente la guaina mielinica poco a poco. Aumentano i livelli di IL-2 e IL-17 che sono quindi usati come marker di aggravamento della patologia. I macrofagi inglobano poco a poco la mielina. La sclerosi è detta "multipla" o "a placche" perché avviene in momenti diversi della vita: ci sono degli attacchi in cui il meccanismo autoimmune si attiva, compaiono dei sintomi non facilmente individuabili come ad esempio la perdita di visione laterale della vista. La malattia va avanti per decenni perché ogni attacco può avere un recupero e i nervi coinvolti non sono vitali. Non c'è un sintomo classico e caratteristico della malattia, dipende dal nervo che viene colpito.

SLA

È una patologia dei motoneuroni, SLA = sclerosi laterale amiotrofica. Incide pesantemente sulla capacità di movimento del soggetto. La SLA è definita tale solo quando riguarda entrambi i neuroni che sono coinvolti nel movimento, entrambi i motoneuroni sono atrofici.

Il motoneurone va incontro ad atrofia: il corpo neuronale e l'assone si assottigliano, atrofizzano e si possono trovare i granuli di atrofina. Il motoneurone ingloba tutto ciò che non gli serve. Perdo la capacità di controllo del movimento.

La patologia compare su un solo gruppo muscolare all'inizio, una debolezza alle braccia o un formicolio ad esempio. La malattia però è cronica, l'avanzamento clinico produce la perdita di funzionalità di tutti gli arti. L'unico modo per comunicare è il movimento degli occhi. Si muore per paralisi respiratoria di circa 3-5 anni.

Nel 1993 sono stati identificati casi di SLA ereditaria che hanno la mutazione del gene della super-ossido dismutasi 1, l'enzima che ci protegge dallo stress ossidativo nelle cellule: raccoglie i radicali liberi dell'ossigeno e li disproporziona ad acqua. Il gene del SOD1 non funziona nella SLA, c'è un eccesso di stress ossidativo. Per confermare questa ipotesi si sono costruiti geni *know-out* e si è visto che i topi non hanno alcuna patologia. Questi topi con SOD1 iper-espressa invece manifestano il danno al motoneurone, si suppone che il vero problema sia la SOD1 mutata che aggrega nel motoneurone, diventa insolubile e si porta via la capacità difensiva del motoneurone. C'è una *game of function* della SOD1. Forse ci sono altre proteine che si aggregano portando al sequestro del sistema immunitario nel neurone, le proteine sono del citoscheletro: perferina e dinactina.

13/05/2016

MALATTIE DELL'APPARATO EMATOPOIETICO: Anemie

E' la diminuzione della capacità del sangue di trasportare ossigeno. Le cause possono essere varie:

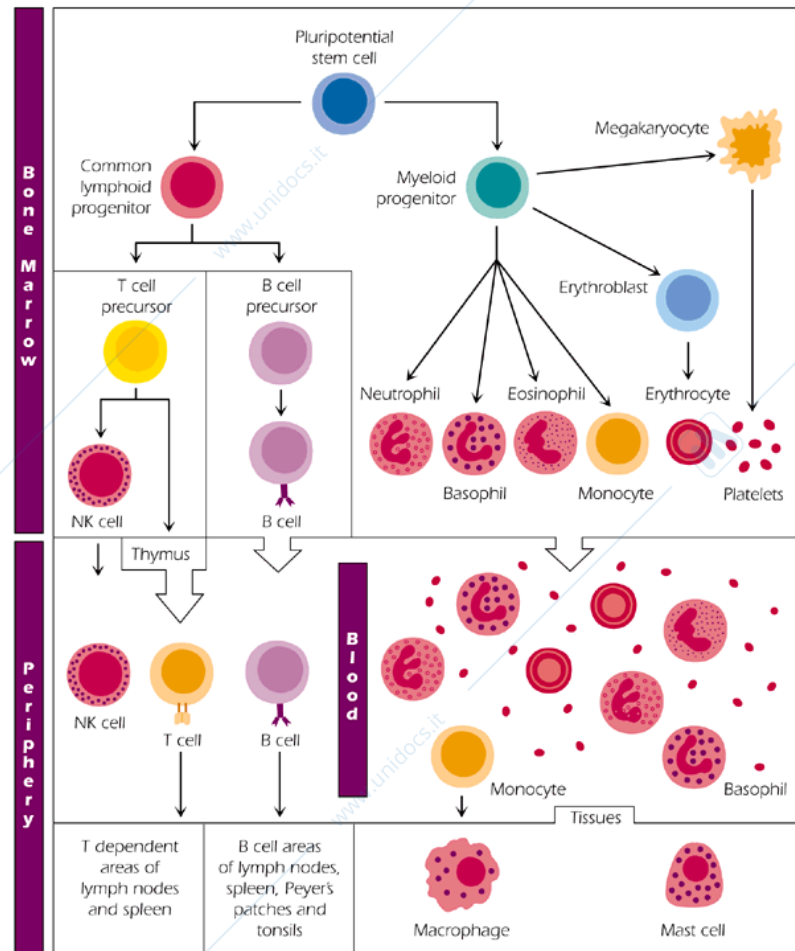
- ✓ **Emorragie** per traumi, rottura di un aneurisma o mancata coagulazione (emofilia, se manca il fattore ottavo e c'è una lesione). L'emorragia può essere acuta o cronica e dare sintomi diversi se è prolungata o meno.
- ✓ **Diminuita produzione di eritrociti**: non li perdiamo ma il midollo osseo ne produce di meno.
- ✓ **Eccessiva emolisi o rimozione splenica degli ematociti**. Questo può essere associato a splenomegalia perché la milza essendo più grossa elimina più eritrociti.

Gli eritrociti derivano dagli eritroblasti, che a loro volta derivano dal precursore mieloide (lo stesso delle cellule dell'immunità innata).

Gli eritroblasti sono cellule nucleate che maturano in eritrociti nucleari nel sangue periferico. La maturazione avviene in circa 20 giorni, possono maturare in vitro usando i fattori di crescita come l'eritropoietina oppure partendo da cellule staminali CD34+ che ritroviamo nel sangue periferico di adulti. Queste cellule sotto opportuna stimolazione possono diventare macrofagi ma anche eritrociti (se stimolati con eritropoietina).

Gli eritrociti sono nucleati fino ai 20 giorni: dopo 2 giorni sono pro-EB, dopo 4 baso-EB, poly-EB agli 11 giorni, ma perdono il nucleo dal 14° giorno e prendono il nome di ortho-EB. Si assiste ad una proliferazione continua di eritroblasti.

Compaiono marcatori importanti come la GpA (glicoforina A), che ha massima espressione dal 7° giorno, e il CD71 che è il recettore della transferrina, molecola che trasporta il ferro. Il CD71 non viene espresso dalle cellule staminali finché esse non ricevono il segnale di diventare globuli rossi, questo recettore è necessario per prelevare ferro dall'ambiente esterno e sintetizzare eme.



Dal 14° giorno il nucleo si perde, c'è un'enucleazione. La sintesi di ferro è necessaria per l'eritrocita maturo che una volta perso il nucleo non può più sintetizzare niente. La sintesi dell'emoglobina adulta è $\alpha_2\beta_2$, ognuno di queste quattro catene lega ferro, nella vita fetale si trova già al secondo trimestre di gravidanza. In vitro, per arrivare all'emoglobina $\alpha_2\beta_2$ si passa dall'emoglobina fetale

$\alpha_2\gamma_2$ che dall'11° giorno inizia a produrre la catena β e quindi l'emoglobina adulta. Nei primissimi giorni dell'embrione, a due settimane dal concepimento (siamo ancora nel sacco vitellino), abbiamo la produzione di emoglobina $\zeta_2\varepsilon_2$ (detta embrionale) che diventa emoglobina fetale a partire dal 7° giorno.

La diagnosi di anemia avviene attraverso l'esame dell'emocromocitometrico.

Questo esame permette di vedere quante sono le cellule per numero di sangue: eritrociti, globuli bianchi e sotto famiglie. Possiamo calcolare:

- Il numero di cellule presenti nel sangue;
- La quantità di emoglobina per mm^3 ;
- Il valore di ematocrito, ovvero il volume in percentuale occupato dagli elementi corpuscolati nel sangue se facciamo centrifugare un mL di sangue tarato a 100. A seconda dell'altezza a cui si deposita la parte corpuscolata si vede l'ematocrito, di solito è il 30-40% di cui la maggior parte sono globuli rossi (milioni in più rispetto ai globuli bianchi). Negli sportivi di solito l'ematocrito arriva sopra il 40%, diminuisce la componente liquida del sangue che diventa più denso con rischi di trombosi. L'ematocrito sarà basso in corrispondenza di anemia con eccessiva eliminazione di eritrociti.
- Il valore corpuscolare medio (ci permette di distinguere anemie macrocitarie da microcitarie), l'emoglobina corpuscolare media (quantità emoglobina/eritrociti totali) e la concentrazione media di emoglobina corpuscolare.

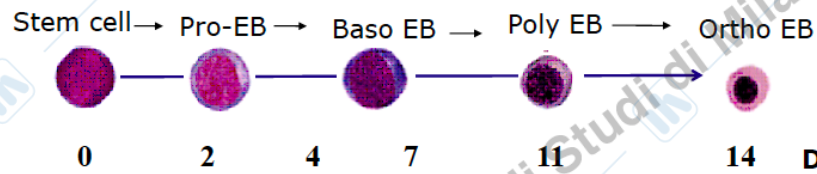
Le variabili che alterano gli intervalli di riferimento per emoglobina e ematocrito sono:

- Età (invecchiando ne producono meno);
- Sesso (le donne hanno sempre meno globuli rossi);
- Altitudine del luogo di residenza (più eritrociti se si vive ad alte altitudini);
- Gravidanza (c'è un aumento di volume circolante, quindi una diluizione dei globuli rossi);
- Fumo.

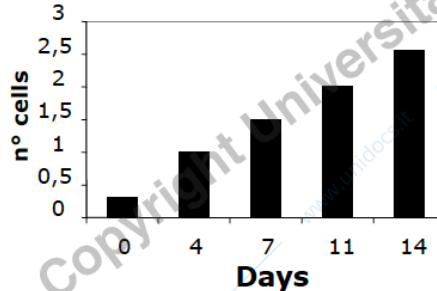
La conta leucocitaria viene eseguita con uno strumento automatico o in laboratorio su uno striscio di sangue. L'analisi ci dà dei valori da confrontare con i valori standard.

I globuli rossi sono $4-6 \times 10^6$ RCB/ mm^3 , molto di più rispetto ai globuli bianchi che sono circa 4300-10800 cellule/ mm^3 . I reticolociti sono i globuli rossi immaturi che hanno già perso il nucleo e necessitano di 24-48 ore per maturare del tutto e andare in periferia. Il loro numero può aumentare se arrivano dei segnali che dicono di produrre più eritrociti: se nel sangue periferico normale possiamo contare 1-2% di reticolociti, sotto sforzo e richiesta possiamo arrivare al 4% (anche nei casi di anemia).

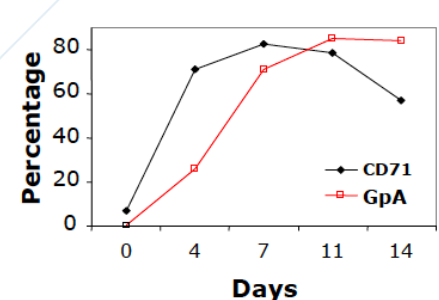
CD34⁺ towards erythrocytes



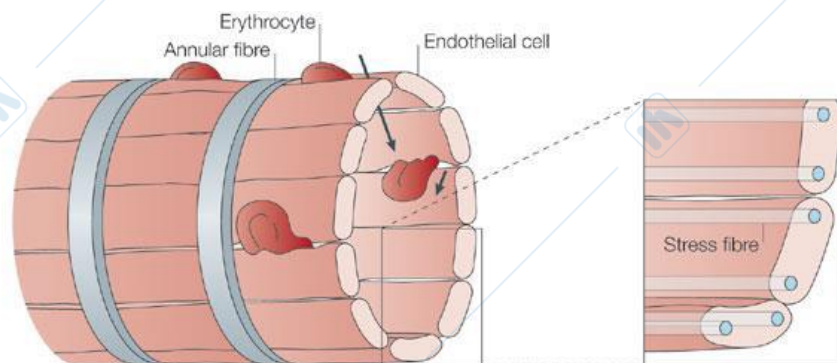
Cell proliferation



Cell differentiation: flow cytometry



L'**emocateresi** è la distruzione fisiologica degli eritrociti avviene prevalentemente nella milza, nel fegato e altri distretti con macrofagi. Questo evento può non avvenire in seguito ad interventi chirurgici. La vita media dei globuli rossi è 120 giorni, vengono eliminati nella polpa rossa della milza che ha una doppia circolazione: nei seni della polpa rossa (delle lacune nella milza) ci sono le zone che sono rivestite di cellule endoteliali con fibre del citoscheletro, dette *stress fibre*, queste fanno in modo di regolare l'adesione delle cellule endoteliali l'una all'altra, creando delle fenestrature. Questi spazi di circa 3 micron servono agli eritrociti per passare selettivamente. Possono passare solo gli eritrociti giovani (4,5 micron) perché hanno flessibilità del citoscheletro e quindi sono capaci di contrarsi. Le emazie incapaci di passare questa barriera rimangono al di fuori del filtro splenico, vengono bloccate e distrutte dalle cellule fagocitiche.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

La rigidità (o deformabilità) dei globuli rossi è un elemento essenziale per la loro vita: una patologia che irrigidisce i globuli rossi li porta alla morte più velocemente perché la milza li sequestra prima. In alcuni tipi di anemia in cui cambia il citoscheletro del globulo rosso, il globulo rosso non esce nemmeno dalla milza.

I macrofagi della milza aderiscono alla membrana degli eritrociti con recettori *scavenger* (o frazione C3 del complemento), abbiamo una fagocitosi che permette l'eliminazione di tutti i globuli rossi invecchiati. Tutti gli eritrociti con forma anomala, falciforme ad esempio, vanno incontro a morte precoce perché incapace di adattarsi.

L'anemia porta ad una riduzione dei globuli rossi circolanti: parliamo di anemia quando siamo a livelli <13,5 g/dl di emoglobina nell'uomo, <12,5 d/dL nella donna.

L'anemia è un sintomo di malattia le cui origini possono essere le più varie. Se l'anemia si instaura rapidamente, sintomi dell'anemia sono correlabili alla perdita di volume:

- Ipotensione ortostatica, anche a riposo;
- Tachicardia;
- Vertigini;
- Sincope (= perdita di coscienza transitoria);
- Sudorazione;
- Ansietà;
- Senso di prostrazione;

Essendoci meno globuli rossi, il cuore non ha più sangue da pompare e quindi abbiamo le perdite di volume: si fa subito una flebo di liquido glicosato, soprattutto quando c'è un'emorragia interna.

Se invece l'anemia si instaura lentamente e diventa cronica (come nell'ulcera gastrica), i suoi sintomi riguardano l'ipossia tissutale:

- Dispnea da sforzo;
- Debolezza;
- Fatica;
- Anoressia (ipossia intestinale);
- Insonnia;
- Incapacità di concentrarsi;
- Pallore (specialmente nelle congiuntive, nelle labbra e nel letto ungueale);

Sintomi specifici di anemie sono alterazioni della cute per carenza di ferro, formazione di stomatite agli angoli della bocca, glossite e atrofia a livello delle mucose. La carenza di vitamina B12 si presenta con parestesie e paresi.

Le anemie in cui abbiamo variazioni delle dimensioni degli eritrociti sono dette anisocitosi, mentre quelle in cui varia la forma dell'eritrocita si chiamano poichilocitosi.

A seconda dell'aspetto morfologico dei globuli rossi abbiamo:

- Anemie normocitiche, tra i 3-5 micron con un volume di 80-100 fentolitri.
- Anemie macrocitiche: c'è una maggiore disponibilità di eme, quindi abbiamo una minor produzione di globuli rossi. Volume > 100 fentolitri. Questa disponibilità è dovuta alla carenza di vitamina B12 e acido folico.
- Anemie microcitiche con un volume < 80 fentolitri (tipico delle talassemie) dovute alla carenza di ferro.
- Anemie normocromiche, nel caso in cui i globuli rossi sono colorati di rosso.
- Anemie ipocromiche, nel caso in cui i globuli rossi sono pallidi per mancanza di ferro.

Possiamo avere delle anemie normocitiche nel caso di emorragie acute con sferocitosi (deficienze del citoscheletro: le emazie presentano lo stesso volume finale ma forma diversa) così come nell'anemia falciforme.

Nell'anemia aplastica c'è aplasia del midollo: vengono prodotti meno eritrociti ma normali. Le anemie possono anche insorgere per un'eccessiva perdita di sangue da emorragia acuta (traumi, aneurismi, tumori maligni) o emorragia cronica (ulcera peptica sanguinante, mestruazioni abbondanti, poliposi del colon, colite ulcerosa, sanguinamento emorroidale). In entrambi i casi abbiamo globuli rossi normali.

L'anemia megaloblastica da dei globuli rossi grandi e biconcavi, tipici della carenza di vitamina B12 e acido folico.

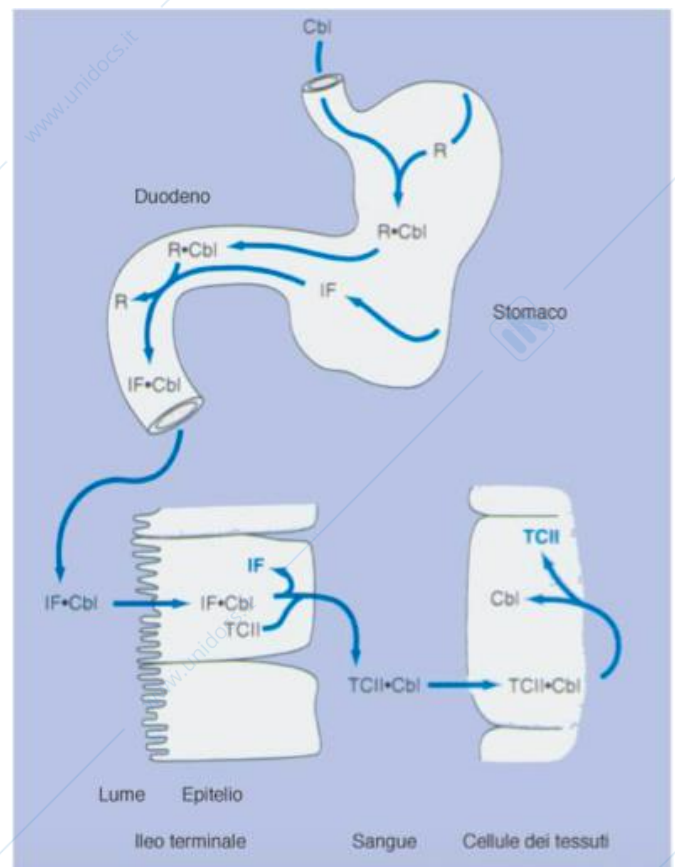
La diminuzione della produzione di RCB può essere data da danni midollari come l'aplasia midollare o il tumore, ma anche dalla carenza di ferro, folati o vitamina B12.

La vitamina B12 può essere introdotta esclusivamente con la dieta: fabbisogno di 2,5 µg/gg, importante nella crescita puberale e si trova in carne, uova e latte. Essa è essenziale per le funzioni dell'SNC, oltre che nella produzione di RCB.

Per essere assorbita correttamente, la vitamina B12 deve essere legata ad un fattore intrinseco (IF): una proteina secreta dalle cellule parietali e da quelle del fondo dello stomaco. La vitamina B12, detta anche cobalamina (Cbl), viene unita a una proteina F, poi al fattore intrinseco (IF) che la trasporta all'intestino, diventa cianocobalamina e viene assorbita. Una malattia di tipo autoimmune che può portare alla carenza di B12 è l'anemia perniziosa dovuta alla minore produzione di IF a livello dello stomaco.

Cause della carenza di vitamina B12:

- Dieta carente (malnutrizione o veganismo);



- Alcolismo cronico, perché danneggia la mucosa di stomaco e intestino;

- Disordini intestinali(come la celiachia);

Sintomi possono essere:

- Perdita di appetito;
- Diarrea;
- Pallore;
- Mancanza di respiro;
- Interventi chirurgici intestinali demolitivi estesi;
- Anemia perniciose(patologia autoimmune causata dalla mancanza di IF)
- Stanchezza;
- Debolezza;
- Ematocrito basso ed elevato MCV.

Del tutto simile è la carenza di acido folico necessario per la sintesi delle purine e quindi in tutte le cellule proliferanti. E' presente in verdura, frutta e fegato di animale e deve essere introdotto costantemente nella dieta. Le cause che possono portare ad una carenza di acido folico sono le stesse della carenza di vitamina B12. Se c'è un'aumentata richiesta di globuli rossi(nella gravidanza ad esempio) si assumono integratori con acido folico e vitamina B12.

L'anemia da carenza di ferro è tipica del 20% delle donne, del 50% delle donne in gravidanza e 3% degli uomini. Le mestruazioni continue sono un problema in questo senso. Il ferro ha un equilibrio peculiare: viene introdotto con la dieta, ha un assorbimento difficile e non può essere accumulato perché è tossico(tanto ne viene assunto quanto ne viene eliminato). Se si accumula ferro abbiamo delle patologie dette emocromatosi, molto più gravi delle anemie.

Le carenze di ferro sono ipocromiche, spesso microcitarie. L'assorbimento avviene prevalentemente nel duodeno e nella parte superiore del digiuno, la sua assunzione avviene grazie ai muscoli nelle carni rosse(contengono mioglobina e emoglobina di rapido assorbimento). Il ferro è presente anche nelle verdure, solo che è in forma di Fe^{3+} che non è facilmente assimilabile.

Il ferro può essere immagazzinato sotto forma di una proteina complessa: la ferritina, unica forma fisiologica di stoccaggio di ferro. E' una proteina molto complessa che assume il Fe^{3+} e lo riduce subito a Fe^{2+} , perché questa forma è più solubile e facile da cedere. La ferritina arriva nei mitocondri degli eritrociti per sintetizzare l'eme, si ritrova in tutti i tessuti cellulari(specialmente negli epatociti). La ferritina è formata da ferro legato all'apoferritina.

Il ciclo endogeno del ferro inizia dai macrofagi di milza e midollo osseo che fagocitano gli eritrociti vecchi, digeriscono l'eme(poi convertita a biliverdina dall'eme-ossigenasi) e separano la protoporfirina IX(tetra-pirrolo) che verrà poi convertita a eme. Tutte le patologie epatiche che accumulano la bilirubina(ittero) sono dovute alla insolubilità del ferro. L'emocateresi a livello della milza produce tanto ferro captato dai macrofagi che possono formare ferritina oppure viene trasportata dal sito di assorbimento(intestino) al sito di liberazione(milza) grazie alla transferrina. In alternativa può essere portato dal fegato al midollo per essere utilizzato.

L'emosiderina è una forma impaccata di ferritina in cui la proteina è parzialmente degradata. E' un aggregato di emoglobina colorabile, nelle riserve normali di ferro ci sono tracce di emosiderina nei macrofagi del fegato, della milza e del midollo osseo, ma anche nel reticolo endoteliale a ridosso del sistema linfoide. Quando abbiamo accumuli di emosiderina o ferritina esse si ritrovano soprattutto nei tessuti epatici, nel cuore(cardiomiociti: precipitati di emosiderina sono molto tossici).

La diagnosi di anemia da carenza di ferro si fa guardando la quantità di ferro legata alla transferrina che circola (50-150 microgrammi/dL), detta **sideremia**, valutando la capacità totale di legame del plasma per il ferro, TIBC (*total iron binding capacity*).

Un altro calcolo che si può fare è vedere quanto è saturata la transferrina, in quantità normali è satura al 25-50%: $\text{sideremia/TIBC} \times 100$.

Il calcolo di ferritina circolante ci dà lo stato di salute del paziente, ci dà informazioni riguarda alle riserve totali di ferro nell'organismo:

- ✚ Nel maschio, circa 100µg/L, corrispondente a una riserva di 1 grammo,
- ✚ Nella femmina, 30µg/L che riflettono una ridotta riserva (circa 300-400 mg).

L'anemia della carenza di ferro ha come cause:

- Insufficienza di assunzione
- Deficit di assorbimento
- Perdite elevate (mestruazioni, coliti, tumori o farmaci aspirina FANS)

I sintomi di questa carenza sono gli stessi della carenza da vitamina B12, con in aggiunta possibili mal di testa frontali e colorazione bluastra della sclera.

I soggetti più a rischio sono le donne in gravidanza, le donne in età fertile, le persone malnutrite e gli adolescenti in rapida crescita.

Le anemia emolitiche sono caratterizzate da una maggior demolizione di globuli rossi, anziché una minore produzione. Se vengono emolizzati più globuli rossi, abbiamo un eccesso nel recupero di eme e ferro contenuti al loro interno: la protoporfirina IX viene degradata a protoferrina e bilirubina (poco solubile). Il fegato la glucorona per renderla solubile, la mette nella bile per eliminarla con le feci, ma se non riesce a coniugarla tutta avremo un eccesso di bilirubina non coniugata nel sangue che porta all'ittero.

Sferocitosi ereditaria

L'accumulo di ferritina e ferro in tessuti che normalmente non hanno ferro ha effetti tossici. Inoltre, essendoci una perdita importante in periferia abbiamo la mancanza di un segnale per produrre eritropoietina. C'è un'iperstimolazione midollare ed un aumento del numero di reticolociti nel sangue. Una delle patologie più diffuse di questo tipo è la sferocitosi ereditaria, con base genetica.

E' dovuta alla carenza o mutazione della spectrina e dell'ankirina (proteine che costituiscono la maggior parte del citoscheletro degli eritrociti, ma presenti in tutte le cellule).

Gli eritrociti sferici sono più rigidi, meno deformabili e soggetti al sequestro splenico, le persone con questa patologia presentano splenomegalia. La splenectomia in questi pazienti è molto di beneficio perché si toglie il filtro nei globuli rossi che invece di morire, tornano in circolo e vengono eliminati a livello epatico, in modo più lento.

Un'altra patologia, più grave perché causa emolisi a seguito di uso di farmaci, è dovuta ad un difetto della glucosio-6-fosfato deidrogenasi che è responsabile della rigenerare il NADP a NAPH.

Il NAPH è essenziale per portare il glutazione da ossidato a ridotto che (in questa forma) è capace di fare da *scavenger* ai radicali liberi: se c'è uno

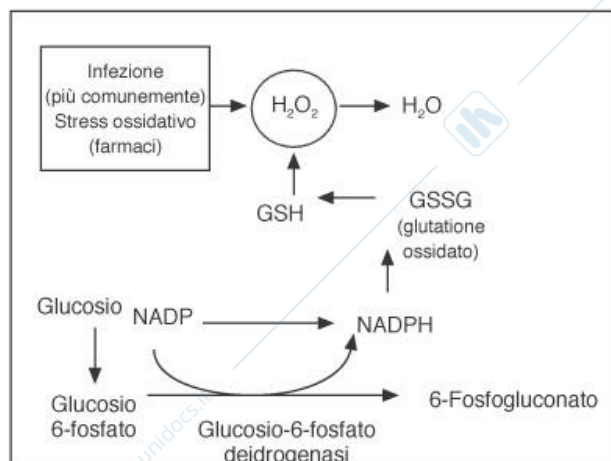


FIGURA 11-9. Shunt degli esosi monofosfati e carenza della glucosio 6-fosfato deidrogenasi.

stress ossidativo nella cellula interviene a proteggerla. Se NAPH è ridotto riesce ad assorbire elettroni, si ossida e si mantiene la redox. La carenza di glucosio-6P deidrogenasi causa un maggior stress ossidativo e una carenza enzimatica del metabolismo del glutatione.

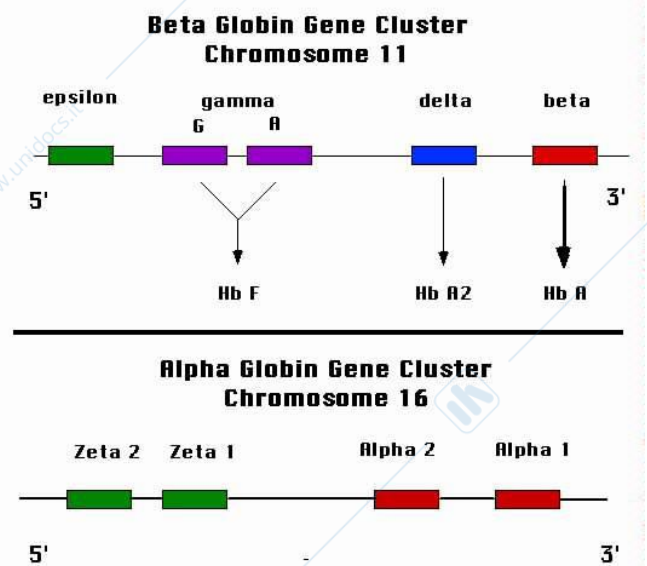
E' una malattia legata al sesso(maschi più colpiti), ereditaria e molto diffusa nella popolazione di colore(forse perché gli eritrociti sono resistenti alla malaria).

La malattia può essere asintomatica, finché gli eritrociti non subiscono stress ossidativo in seguito ad esposizioni a farmaci o tossine, infezioni, etc. I globuli rossi vengono denaturati e ossidati, l'emoglobina denaturata si accumula al loro interno formando dei precipitati(detti corpi di Heinz). I farmaci utilizzati per curare questa patologia sono gli anti-malarici, l'aspirina ad alte dosi ed i sulfonamidi. Si eseguono dei test su questi farmaci mettendoli in vitro sull'emoglobina normale.

Emoglobinopatie

Nella zona del mediterraneo sono molto diffuse le emoglobinopatie: anomalie strutturali dell'emoglobina, dovute a mutazioni per cui l'emoglobina come molecola è alterata e non funziona. Ne sono state descritte circa 300. Queste patologie non riguardano il gruppo eme, sono alterazioni delle catene proteiche.

L'emoglobina adulta(detta HbA, 96% della nostra) è codificata dalle catene α_2 e β_2 , i geni della α globina sono nel cromosoma 16 mentre quelli della β si trovano sul cromosoma 11. Sono espressi in modo co-dominante(esprimiamo sia allele paterno che materno) come l'HLA(sono gli unici che lo fanno). In totale quindi esprimiamo 4 geni, mentre nella catena β avremo solo l'espressione di un allele. Nel cromosoma 11 abbiamo anche i geni che codificano le catene γ e ϵ . La catena γ forma l'emoglobina fetale, si nasce sempre con un po' di emoglobina fetale($\gamma_2\beta_2$) che permane fino ai sei mesi di vita.

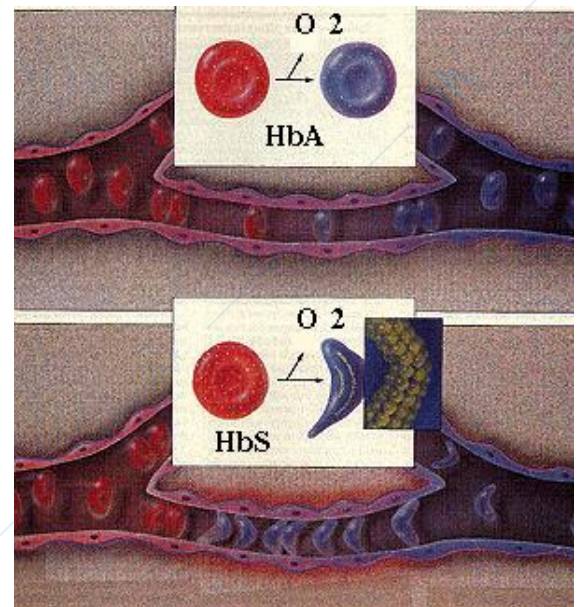


Una delle forme più caratteristiche di anemia molto diffuse è quella dell'**anemia falciforme**(Sickle cell anemia), chiamata così per l'aspetto degli eritrociti. E' mutata la catena β sia nell'allele paterno che materno: si cambia la valina in acido glutammico nella posizione 6.

Gli individui omozigoti hanno tutta l'emoglobina A sostituita con l'emoglobina S(*sickle*, falce in inglese). La mutazione può esser presente in entrambi gli alleli: negli omozigoti è tutta mutata, mentre negli eterozigoti solo nell'50%.

L'anemia è molto diffusa in Africa, nelle zone endemiche della malaria, negli stati uniti ci sono molti migranti che l'hanno portata durante le immigrazione, circa il 10% della popolazione di colore statunitense.

I globuli rossi quando sono deossigenati cambiano conformazione: l'80% del citoplasma si modifica cambiando la forma del globulo rosso. L'emoglobina normale è sempre solubile ed esiste come molecola sia in forma ossigenata che deossigenata, mentre l'emoglobina S in carenza di ossigeno(deossigenata) polimerizza. Le catene β fanno sì che le molecole di emoglobina diano luogo a grossi aggregati di emoglobina che precipitano nel citoplasma, polimerizzano e assumono una



conformazione a falce di rigidità maggiore. Abbiamo delle crisi falcemiche di eritrociti che non riescono più a circolare nei capillari periferici, abbiamo occlusioni microvascolari, danni ischemici e trombosi che causano forte dolore.

Questa anemia nelle forme omozigotiche si scopre dopo 6 mesi di vita, l'emoglobina fetale $\alpha_2\gamma_2$ lega bene l'ossigeno e quindi la patologia si manifesta solo quando viene espressa l'emoglobina adulta. Gli eritrociti vengono sequestrati dalla milza con conseguente splenomegalia, ematocrito basso (18-30%, rispetto al 30-45% normale), reticolocitosi (il midollo deve produrre di più), ittero, crisi dolorose e iperbilirubinemia. Si può arrivare ad una crisi falcemica se improvvisamente necessitiamo di un consumo di ossigeno per sforzo o ossidazione della cellula.

Talassemie

Simili a queste patologie sono tutte le talassemie: gruppo eterogeneo di disordini genetici della sintesi di emoglobina per assenza o ridotta sintesi delle catene della globina.

Sono malattie associate al mare, più diffuse delle anemia falciformi (in Italia): la loro distribuzione segue quella della malaria, ovvero si manifesta in Sardegna, Agropontino e Calabria. I pazienti che hanno una forma eterozigote di talassemia non muoiono di malaria, ma non muoiono nemmeno di anemia che è letale solo negli omozigoti. Queste modifiche dell'emoglobina si sono diffuse nei millenni e si sono mantenute con la stessa distribuzione geografica.

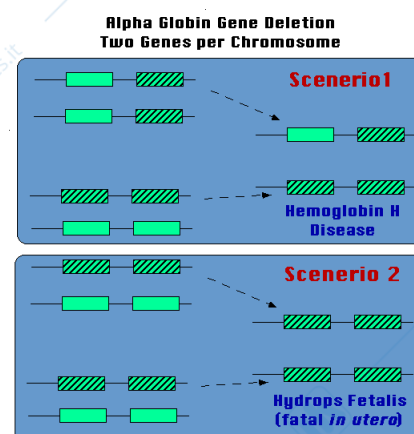
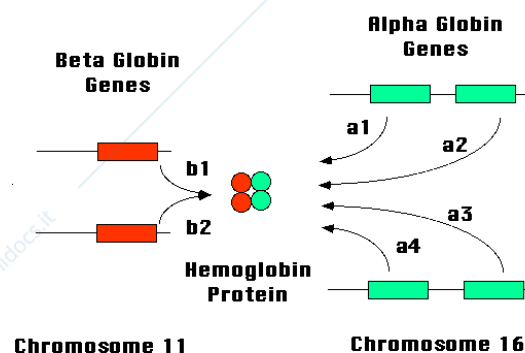
Abbiamo circa 3 milioni di portatori sani di tipo β in Italia, il tipo α è tipico del sud-est asiatico. Nella α -talassemia abbiamo una ridotta sintesi di catene α , mentre nella β -talassemia una ridotta (β^+ talassemia) sintesi o assenza (β^0 talassemia) delle catene β . Avremo forme diverse a seconda che le mutazioni si presentino su tutti e 4 i geni della catena α , a differenza della catena β in cui i geni che si possono alterare sono solo 2 (solo 2 geni si occupano di questa espressione).

La α -talassemia si può presentare con:

- 4 i geni alterati. Siccome fa parte dell'emoglobina fetale, abbiamo morte in utero perché non si sintetizza qualsiasi tipo di emoglobina.
- 2 geni mutati e 2 non. Avremo un'anemia lieve che è compatibile con la vita.
- 3 geni alterati e uno funzionante, caso più grave.

La β -talassemia invece si presenta come:

- *Talassemia major*, in cui abbiamo β^0/β^0 ovvero non viene sintetizzata la catena β oppure $\beta^+\beta^0$ in cui una delle due non viene mutata. Questo è un caso molto grave che necessita di trasfusioni di sangue. Abbiamo un indice di emoglobina bassissima, 4-6 g/dL. I globuli rossi sono meno di 2 milioni. Ci sono cambiamenti di forma che li rendono disomogenei. Il midollo è iperplastico.
- *Talassemia intermedia* è data da due geni mutati ($\beta^+\beta^+$). Questo tratto talassemico è molto presente in Italia dovuto all'unione tra un portatore ed un individuo sano. I globuli rossi sono microcitici, i bambini appena nati vengono controllati: se i globuli rossi sono piccoli si attua un legame genetico.
- *Talassemia minor*, presenta un gene β normale e un gene β talassemico (β/β^+).



Tutte le talassemie sono caratteristiche con tetrametri di α che legano l'eme ma non cedono ossigeno, oppure da tetrameri fatti da due catene β . Le anemie eterozigoti sono più lievi rispetto alle omozigoti che sono caratterizzate da emocrisi: accumulo di ferro, un'aumentata eritropoiesi (anche extra-midollare), deformità scheletriche, ittero e anemia ipocromica microcitica.

La terapia contro le talassemie si basa sul trapianto di midollo osseo (TMO), trasfusioni e l'uso di chelanti del ferro (desferale e deferiprone).

Il trapianto è risultato essere molto valido: sia quello di midollo osseo che quello di cellule (staminali) a partire da midollo osseo, sangue periferico, cordone ombelicale, tessuti fetali od embrioni. Anche la terapia genica è molto efficace, soprattutto per curare la talassemia major.

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari