UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

Studio delle relazioni tra vaccino contro il virus influenzale, ceppi di lattobacilli e sistema immunitario: effetto adiuvante in modello murino

Relatore: Chiar.mo Prof. Ignazio Castagliuolo

Co-relatrice: Chiar.ma Prof.ssa Paola Brun

Laureando: Andrea Scapin

Anno Accademico 2025-2026

SOMMARIO

RIASSUNTO 1

INTRODUZIONE 3

Anatomia e istologia del sistema immunitario 3

Riconoscimento specifico dell'antigene 12

Anticorpi 12

Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) 17

Recettori e molecole dei linfociti T 27

Citochine 37

Maturazione dei linfociti 48

Attivazione dei linfociti T 52

Attivazione dei linfociti B e risposte anticorpali 58

Ricircolazione dei linfociti 68

Immunità cellulo-mediata 75

Immunità umorale 83

Influenza 91

Immunizzazione 102

Microbioma dell'apparato digerente 108

Tessuto linfoide associato alle mucose 119

SCOPO DELLA TESI 142

MATERIALI E METODI 143

Materiali 143

Disegno sperimentale 144

Tecniche di analisi 145

Operazioni tecniche e analitiche 146

RISULTATI 152

Analisi citofluorimetriche delle cellule spleniche 152

Anticorpi 157

DISCUSSIONE 162

CONCLUSIONI 164

SEZIONE BIBLIOGRAFICA 167

POSTFAZIONE 191

RIASSUNTO

Introduzione

I probiotici modulano le funzioni immunitarie mucosali e sistemiche regolando le attività delle cellule immunitarie, tra cui la produzione di anticorpi e le risposte cellulo-mediate. Le azioni immunomodulanti dei probiotici sono state investigate nel trattamento e nella prevenzione di patologie legate a disordini del sistema immunitario, nonché in ambito vaccinale, con la ricerca di un effetto adiuvante da parte dei probiotici sull'immunità indotta dalle vaccinazioni. Di fronte a limitazioni di efficacia ed effetti collaterali degli adiuvanti tradizionali, i probiotici potrebbero rappresentare un'attrattiva notevole come adiuvanti, vista la modulazione delle attività dei tessuti linfoidi associati alle mucose e la prospettiva, dunque, di ottenere un potenziamento delle risposte immunitarie indotte dalla vaccinazione.

Scopo dello studio

Con il presente studio si intende analizzare la capacità di tre ceppi di lattobacilli (*L. plantarum*, *L. gasseri* L6, *L. gasseri* CO-L04) di potenziare le risposte immunitarie indotte da un vaccino antinfluenzale inoculato per via intramuscolare.

Materiali e metodi

Topi BALB/c sono stati divisi in gruppi, a ciascuno dei quali è stato somministrato uno specifico ceppo probiotico per via intranasale (10^6 CFU/die) oppure intragastrica (10^9 CFU/die), ad eccezione di due gruppi di controllo, trattati invece con solo PBS sterile. Dopo 6 gg di trattamento, si è proceduto all'immunizzazione degli animali con un vaccino antinfluenzale in commercio, alla dose di 2,1 µg di emoagglutinina (HA) totale per via intramuscolare, e il trattamento con probiotici è stato esteso per altri 6 gg. Il vaccino è stato inoculato a tutti i topi trattati con i probiotici, mentre dei due gruppi di controllo ne è stato vaccinato soltanto uno. Il sacrificio degli animali è avvenuto dopo 21 gg dall'immunizzazione. I campioni prelevati sono stati, per ogni topo, il sangue, al fine della misurazione delle risposte umorali sistemiche (IgG totali, IgG1, IgG2a) mediante ELISA, il tessuto polmonare, per la quantificazione delle risposte umorali mucosali (IgA) con ELISA, e la milza, per la quantificazione dei linfociti T e B mediante citometria a flusso con o senza *challenge in vitro*.

Risultati

Un aumento significativo dei linfociti T si è osservato negli animali trattati con tutti i ceppi probiotici somministrati mediante *gavage* intragastrico; nei gruppi di animali trattati con i ceppi probiotici per via intranasale, tale effetto non si è presentato con alcuno dei probiotici. Nessun probiotico è stato in grado di incrementare la percentuale di cellule B spleniche. Nel siero, un aumento significativo delle IgG virus-specifiche totali è stato ottenuto solo con *L. plantarum* intranasale, mentre considerando singolarmente IgG1 e IgG2a, si è evidenziato l'incremento con *L. plantarum* somministrato per via intranasale e intragastrica. Nel tessuto polmonare non

appariva un aumento significativo di IgA virus-specifiche per alcuno dei gruppi assegnati ai probiotici rispetto ai topi immunizzati ma non trattati con probiotici.

Discussione

L. plantarum, *L. gasseri* L6 e *L. gasseri* CO-L04, quando somministrati mediante *gavage* intragastrico, dimostrano un interessante effetto adiuvante sulla vaccinazione antinfluenzale incrementando la percentuale di linfociti T splenici. Conversamente, gli stessi probiotici non aumentano invece la percentuale di cellule B attivate e della memoria. *L. plantarum* promuove inoltre le risposte umorali sistemiche antinfluenzali. Tuttavia, *L. plantarum* non potenzia le relative risposte anticorpali mucosali polmonari.

INTRODUZIONE

ANATOMIA E ISTOLOGIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Il sistema immunitario è l'insieme di molecole, cellule e processi biologici deputati alla difesa dell'organismo da agenti biologici estranei e da cellule tumorali (1). Molte specie viventi tra cui l'uomo hanno sviluppato un'immunità innata ed una adattativa. L'immunità innata è un complesso di processi fisiologici che vengono attuati come prima linea difensiva in caso di infezione, ma essa non è specifica per il microrganismo coinvolto. I suoi meccanismi effettori si ripetono allo stesso modo al ripresentarsi di una stessa causa di infezione, e si originano a partire dal riconoscimento di strutture molecolari comuni ad un gran numero di microbi, senza discriminazione per la singola specie microbica. I suoi principali componenti sono le barriere fisiche naturali date dagli epiteli, assieme alle sostanze antimicrobiche da essi prodotte, le cellule ad attività fagocitica quali macrofagi e neutrofili, le cellule Natural Killer (NK), ad attività citotossica, le proteine del sistema del complemento e le citochine, messaggeri chimici di natura proteica che regolano l'azione delle cellule dell'immunità. Oltre questa prima e precoce linea di difesa, l'agente microbico mette in moto anche meccanismi di immunità adattativa, ben più specifici rispetto all'immunità innata, ma che impiegano un tempo maggiore ad instaurarsi. Le caratteristiche dell'immunità adattativa sono la notevole specificità nel riconoscere macromolecole legate al singolo microrganismo, la memoria conservata per lungo tempo e la capacità di incrementare la potenza della risposta ad ogni successiva esposizione allo stesso patogeno. L'immunità acquisita è operata dai linfociti e dalle molecole da essi prodotte. L'immunità innata e quella acquisita sono strettamente connesse tra loro: l'intervento dell'immunità innata porta all'attivazione delle risposte adattative, principalmente mediante la presentazione dell'antigene ai linfociti, i quali a loro volta attuano l'eliminazione del microbo anche stimolando le attività dell'immunità innata. Un'altra essenziale peculiarità della fisiologia del sistema immunitario è la capacità di riconoscere solo materiale eterologo (*non-self*), ossia estraneo all'organismo, e di esercitare le risposte selettivamente su di esso, risparmiando tutte le molecole autologhe (*self*). Tale fenomeno è noto come tolleranza al *self*. Aberrazioni nell'induzione e nel mantenimento della tolleranza al *self* scatenano patologie autoimmuni (1).

Antigene, epitopo, adiuvante: definizioni

Un antigene è definito come qualsiasi sostanza in grado di legarsi ad un anticorpo o ad un recettore per l'antigene (1). Sostanze quali zuccheri, intermedi metabolici, lipidi, carboidrati complessi, proteine e acidi nucleici possono essere riconosciute da anticorpi e da cellule della componente innata del sistema immunitario, mentre i recettori delle cellule T riconoscono solo peptidi. Si definisce immunogeno una sostanza in grado di generare una risposta immunitaria. Solo prodotti macromolecolari possono manifestare questa proprietà: piccole molecole, pur potendosi legare ad anticorpi, non sono in grado di elicitare la risposta dei linfociti B. Potrebbero invece indurla qualora si legassero ad una struttura macromolecolare. In tal caso la struttura prende il nome di aptene, mentre la macromolecola funge da "*carrier*". L'anticorpo è in grado di riconoscere solo una piccola porzione di antigene, chiamata determinante antigenico o epitopo, e una macromolecola antigenica può presentare più unità dello stesso epitopo nella propria struttura. Si parla in questo caso di antigene polivalente. Le proteine

globulari non si comportano facilmente da antigeni polivalenti, eccetto quando formano aggregati. Gli acidi nucleici e i polisaccaridi sono polivalenti grazie ai gruppi molecolari che si ripetono nella loro struttura. Quando due o più determinanti antigenici non siano sufficientemente distanti tra loro, si può verificare un'interferenza sterica tra i diversi anticorpi che li legano: si parla di determinanti sovrapposti. Esistono due tipi di determinanti. Il determinante lineare è fornito da una sequenza amminoacidica lineare, mentre il determinante conformazionale è prodotto dal ripiegamento di una macromolecola, coinvolgendo strutture chimiche non contigue. Un determinante può anche generarsi in seguito alla modificazione enzimatica di una macromolecola: si parla di determinante neo-antigenico (1). Un altro concetto fondamentale nell'immunologia è quello di adiuvante, ossia una sostanza capace di potenziare le risposte immunitarie verso un antigene quando somministrata insieme a quest'ultimo (1).

Linfociti

I linfociti sono le uniche cellule in grado di riconoscere in maniera specifica i determinanti antigenici e di formare una memoria immunitaria agli stessi, permettendo quindi all'organismo una risposta specifica e più potente alla reinfezione da parte di uno stesso patogeno (1). I linfociti che non sono stati ancora stimolati da un antigene, noti come vergini, sono cellule del diametro di circa 8-10 micrometri, con un nucleo che occupa la gran parte del volume cellulare e un sottile orlo citoplasmatico caratterizzato da scarsi organelli. Quando i linfociti vengono per la prima volta a contatto con l'antigene, il loro diametro aumenta a circa 10-12 micrometri, con incremento del volume citoplasmatico, aumento del numero di organelli e della quantità di RNA intracellulare. I linfociti si suddividono essenzialmente in due sottopopolazioni, ossia linfociti B e T. Le cellule B sono responsabili della produzione di anticorpi. Le cellule T si distinguono ulteriormente in linfociti T *helper* e linfociti T citotossici. I linfociti T *helper* esprimono prevalentemente il recettore di superficie CD4, mentre a livello dei citotossici si riscontra soprattutto il recettore CD8. Sono stati però descritti anche casi, sebbene infrequenti, di linfociti T *helper* esprimenti il recettore CD8 e di linfociti ad attività citotossica aventi il CD4. Le cellule T *helper* stimolano l'attività di fagocitosi dei macrofagi e l'attivazione dei linfociti B, mentre le cellule T citotossiche effettuano la lisi di cellule tumorali o infettate da virus e parassiti intracellulari. Dal punto di vista morfologico, le sottopopolazioni linfocitarie sono tra loro indistinguibili: i linfociti appaiono identici al microscopio indipendentemente dal loro stipite. I linfociti esprimono a livello di membrana recettori per l'antigene distribuiti clonalmente. In questo modo, ogni clone di cellule linfocitarie possiede un recettore in grado di riconoscere uno specifico peptide, e tale recettore sarà diverso da quello espresso da tutti gli altri innumerevoli cloni, ognuno dedicato ad uno specifico determinante antigenico. Durante la maturazione dei linfociti si verifica la ricombinazione di segmenti del loro DNA, con una conseguente enorme diversificazione del repertorio di recettori espresso dai linfociti (1).

Sistema dei fagociti mononucleati

Il sistema dei fagociti mononucleati comprende i monociti ed i macrofagi (1). I monociti, dal diametro di 10-15 micrometri e dal caratteristico nucleo a fagiolo, si originano nel midollo osseo, dal quale entrano in circolo. Migrati nei tessuti, i monociti si evolvono in macrofagi, cellule morfologicamente diverse dai monociti e con un citoplasma più abbondante. I fagociti

mononucleati svolgono funzioni effettrici sia nell'immunità innata che in quella adattativa. Essi fagocitano microbi e materiale estraneo, processandone gli antigeni e presentandone frammenti ai linfociti T helper, con la conseguente attivazione di quest'ultimi. Esistono inoltre segnali costimolatori che i fagociti forniscono ai linfociti per favorirne l'attivazione, mentre i linfociti T helper secernono citochine stimolanti l'attività dei fagociti. Oltre a possedere recettori tipici dell'immunità innata, manifestano recettori per la porzione cristallizzabile degli anticorpi, permettendo alla cellula il legame a microbi opsonizzati dagli anticorpi e la fagocitosi del complesso antigene-anticorpo (1).

Cellule dendritiche

Le cellule dendritiche, caratterizzate da molte estroflessioni citoplasmatiche, presentano gli antigeni proteici ai linfociti T (1). Esse si trovano allo stato immaturo a livello epiteliale e, una volta captato l'antigene, migrano attraverso i vasi linfatici ai linfonodi, laddove presentano l'antigene ai linfociti T vergini. Durante tale migrazione si ha la maturazione delle cellule dendritiche, le quali assumono così un'elevata efficienza nella presentazione dell'antigene (1). Si riconoscono diversi lignaggi di cellule dendritiche (2). Le cellule dendritiche convenzionali (cDC) derivano da precursori mieloidi, e sono a loro volta distinte in cDC1, presentanti l'antigene ai linfociti T $CD8^+$, e cDC2, che lo presentano ai linfociti T $CD4^+$ (2). Le cDC rilevano microrganismi tramite recettori dell'immunità innata, i PRRs (*Pathogen Recognition Receptors*), tra cui i recettori *Toll-like* (TLRs) (3). A livello delle mucose di polmoni e intestino, le cDC1 riescono ad estendere le proprie estroflessioni negli spazi alveolari e nel lume intestinale, rispettivamente, al fine di campionare antigeni a cui le mucose sono esposte. Le cDC2 hanno invece limitato accesso al lume degli organi, e intercettano i microrganismi quando questi si presentano nella lamina propria. Le cDC presentano l'antigene anche ai linfociti B, inducendo la risposta anticorpale (3). Le cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC), alquanto rare, discendono da un progenitore linfoide (4). Risiedono negli organi linfoidi periferici, ove rappresentano lo 0,1-0,5% delle cellule nucleate, e tra questi ricircolano. Sono dotate del recettore TLR-7, che riconosce RNA a singola catena, e TLR-9, che lega DNA non metilato contenente motivi CpG. All'interazione con queste molecole, le pDC rispondono secernendo massive quantità di interferoni di tipo I, oltre a interferoni di tipo III e altre citochine (4). Le cellule dendritiche derivate dai monociti presentano l'antigene ai linfociti T a livello dei tessuti, ma non è chiaro se abbiano un ruolo rilevante nella presentazione degli antigeni nei linfonodi (3). Le cellule dendritiche, derivanti da precursori midollari, si differenziano dalle cellule follicolari dendritiche, presenti nei centri germinativi dei follicoli linfoidi (1). Le cellule follicolari dendritiche captano antigeni opsonizzati da anticorpi o proteine del complemento e li presentano alle cellule B (1).

Sistema linfoide

Il sistema linfoide ha un'importanza cruciale nelle funzioni immunitarie. Gli organi linfoidi si suddividono in primari e secondari (1). Negli organi linfoidi primari i linfociti nascono e maturano per divenire linfociti B e T vergini. Le cellule linfoidi entrano poi nel circolo sistemico e si accumulano negli organi linfoidi secondari, laddove hanno modo di entrare in contatto con l'antigene. Nei mammiferi, gli organi linfoidi primari sono il midollo osseo ed il timo. Gli organi

linfoidi secondari includono i linfonodi, la milza e il tessuto linfoide associato alle mucose (MALT) (1).

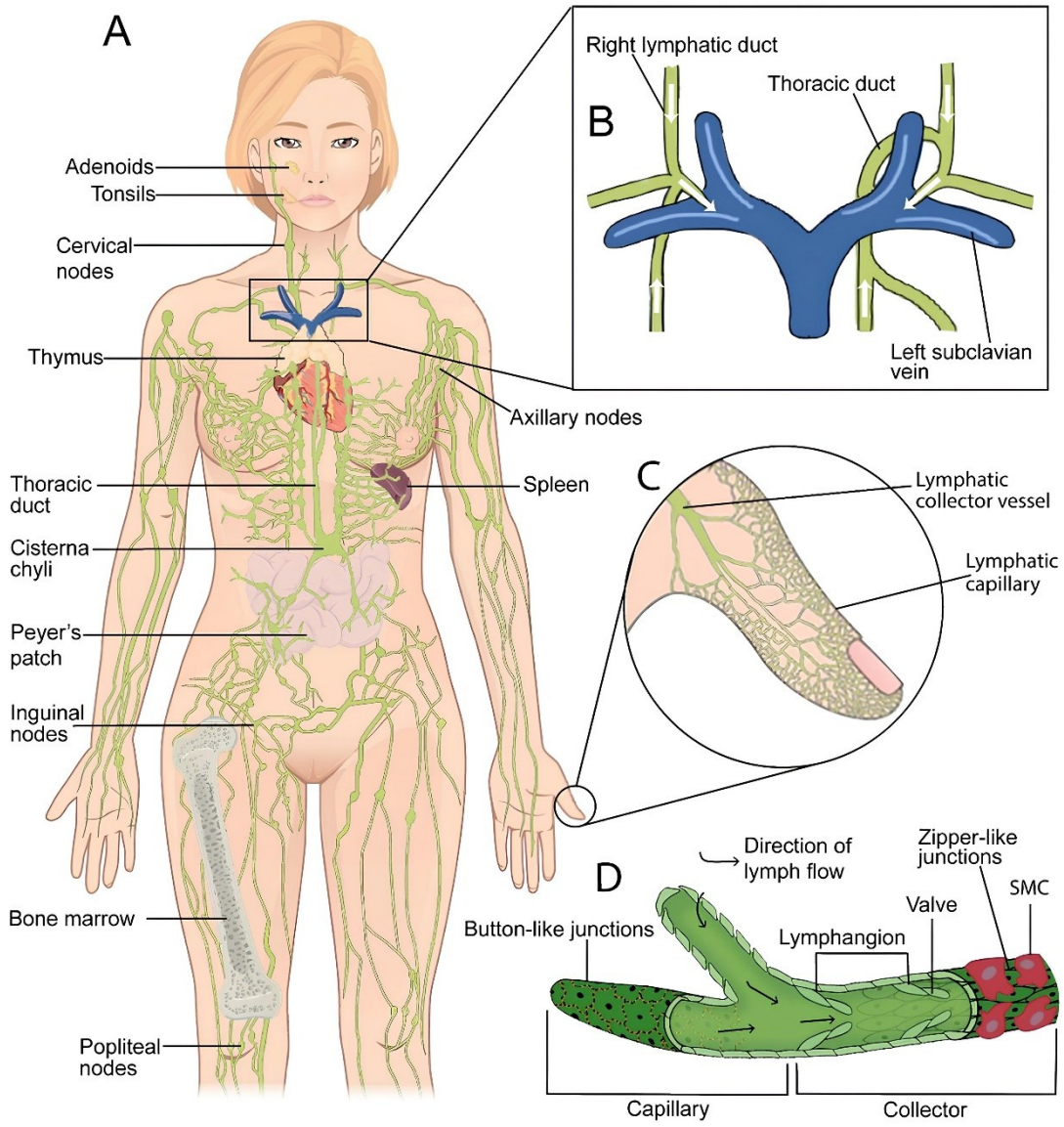

Figura 1. Sistema linfoide (5)**. A**) Anatomia del sistema linfatico e collocazione anatomica dei principali organi linfoidi, tra cui il **midollo osseo**, il **timo**, la **milza** e le **placche di Peyer**. **B**) Giunzioni tra il **dotto toracico** e la vena succlavia sinistra e tra il **dotto linfatico destro** e la succlavia destra. **C**) Microcircolazione linfatica. **D**) Capillare linfatico. Riprodotto su licenza CC BY-SA 4.0.

Midollo osseo

Il midollo osseo è un tessuto molle di consistenza gelatinosa che occupa le cavità delimitate dal reticolo trabecolare all'interno delle ossa (1). Si distingue un midollo osseo giallo, prevalentemente costituito da adipociti, e un midollo osseo rosso, svolgente la funzione emopoietica (6). Quest'ultimo è abbondante in tutte le ossa durante la vita intrauterina, mentre nell'adulto esso è circoscritto allo sterno, alle clavicole, alle vertebre, alle costole, al bacino e alle epifisi delle ossa lunghe (6). Il midollo rosso è costituito da adipociti, fibroblasti, e da un insieme di precursori cellulari distinti in una linea mieloide e una linea linfoide arrangiati

all'interno dello stroma in isolotti di cellule emopoietiche (1,6). Tali aggregati cellulari sono situati in prossimità dei sinusoidi midollari (6). I sinusoidi si originano dalla coalescenza di arteriole, e riversano a loro volta il sangue nelle vene nutritive (6). I precursori mieloidi danno origine a tutte le cellule del sangue ad eccezione dei linfociti B e T, che derivano invece dalla linea linfoide (1). La produzione di determinati tipi di cellule da parte del midollo osseo è stimolata da citochine chiamate CSF (*Colony Stimulating Factors*). La funzione emopoietica è sostenuta prevalentemente dal fegato e dalla milza nella vita fetale, e tali organi possono recuperare questa funzione nell'età adulta in situazioni di aumentata richiesta di cellule ematiche. Le cellule B si originano e completano la propria maturazione interamente nel midollo osseo, cosicché lasciano l'organo ed entrano in circolo attraverso i sinusoidi vascolari. I linfociti T, per contro, accedono alla circolazione in uno stato immaturo e compiono la loro maturazione nel timo (1).

Figura 2. Preparato istologico del midollo osseo (6). In rosso-violaceo si evidenziano le cellule staminali e i progenitori emopoietici, affiancati dagli adipociti, i quali appaiono bianchi. Ben visibili sono anche i sinusoidi, in rosso-fucsia, caratterizzati da evidenti anastomosi. Alcune aree bianche adiacenti ad alcuni dei sinusoidi rappresentano un artefatto di processazione del tessuto.

Timo

Il timo, situato nel mediastino supero-anteriore, è un organo bilobato, i cui lobi sono suddivisi in lobuli, e questi ultimi in lobulini (1). Ciascuno di questi distretti è caratterizzato da una zona corticale, più esterna, e da una midollare, più in profondità. La corticale del timo è densamente popolata da linfociti, mentre nella midollare essi sono più scarsamente distribuiti. Il parenchima timico comprende anche le cellule epiteliali timiche, macrofagi e cellule

dendritiche. Il linfocita T immaturo accede alla corticale timica, ove ha inizio il processo di maturazione, che prosegue mentre la cellula si approfonda maggiormente nell'organo fino ad attraversarne la midollare, strato composto prevalentemente da linfociti T maturi in procinto di lasciare l'organo per entrare nel circolo sistemico (1).

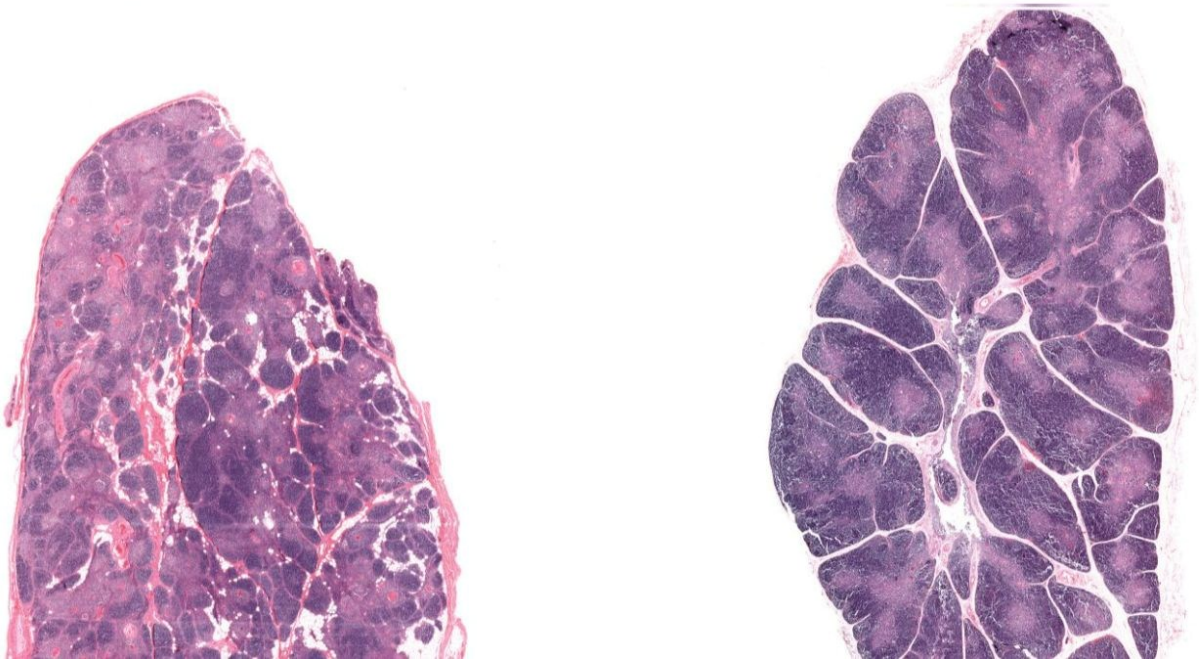

Figura 3. Anatomia microscopica del timo (7)**.** A destra, microfotografia di una sezione di timo neonatale umano, con i lobuli delimtati da setti connettivali che appaiono in bianco. In ogni lobulo, la corticale si presenta di colore violetto, mentre la midollare, più profonda, si distingue per la colorazione malva. A sinistra, microfotografia di una sezione di timo di un adulto. La corticale manifesta un aspetto molto più frammentario, e appare evidente l'involuzione del parenchima timico con la proliferazione di adipociti, rappresentata dalle aree bianche rilevabili particolarmente attorno ai setti connettivali e nella regione sottocapsulare all'estrema destra della sezione. Adattato da https://histologyguide.com/gallery/10-lymphoid-system.html.

Linfonodi

I linfonodi sono aggregati di tessuto linfoide disposti lungo il sistema linfatico (1). Essi drenano la linfa da vasi linfatici chiamati afferenti, convoglianti linfa proveniente dalla periferia. La linfa scorre internamente attraverso un sistema di seni linfatici, riversandosi infine in un vaso efferente, che la trasporta verso il dotto toracico. Il linfonodo è delimitato da una capsula di tessuto connettivo fibroso, da cui si dipartono setti che dividono internamente l'organo. Nel parenchima linfonodale si riconoscono una corticale, una paracorticale e una midollare. La corticale è costituita da follicoli, ossia aggregati di linfociti molto stipati tra di loro, talora comprendenti un centro germinativo. La paracorticale, più interna, è composta da cordoni cellulari comprendenti linfociti, macrofagi e cellule dendritiche. Ancor più in profondità è situata la midollare, organizzata in cordoni che contengono plasmacellule e macrofagi. Appare peculiare la distribuzione delle cellule linfoidi tra le diverse zone. I follicoli della corticale sono costituiti prevalentemente da linfociti B, mentre i cordoni paracorticali ospitano cellule T, di cui circa il 70% sono cellule T *helper* $CD4^+$. I centri germinativi costituiscono zone in cui è avvenuta la stimolazione antigenica, ed è dunque in corso un'attiva proliferazione linfocitaria con maturazione dell'affinità anticorpale. Il sangue accede al linfonodo tramite un'arteria ilare, che perfora la capsula a livello dell'ilo e si dirama in una rete capillare nella corticale. I linfociti

escono dal circolo ed entrano nel parenchima linfonodale attraverso venule ad endotelio alto, site nella paracorticale. Il sangue refluo è raccolto dalla vena ilare. L'organizzazione anatomica del sistema linfatico, con i linfonodi disposti in serie lungo i suoi vasi, rende possibile lo sviluppo dell'immunità specifica ad antigeni che accedono alla circolazione linfatica. I capillari linfatici raccolgono il fluido extracellulare in eccesso evitando la formazione di edemi (1). La linfa circola dai capillari in vasi di calibro sempre maggiore, per poi riversarsi nel circolo venoso tramite il dotto toracico e il dotto linfatico destro (1,8). Assieme alla linfa, nei vasi linfatici entrano cellule dendritiche mature che hanno captato un antigene a livello tissutale, microbi allo stato naturale o opsonizzati, ed antigeni solubili (1). A livello del linfonodo le cellule dendritiche si localizzano nella paracorticale e incontrano i linfociti T a cui presentare l'antigene. Antigeni solubili possono essere captati da cellule dendritiche della paracorticale e dai linfociti B della corticale. I macrofagi della paracorticale e della midollare sono più proni a fagocitare gli antigeni particolati. Così, cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B che hanno processato l'antigene lo presentano ai linfociti T. In questo modo i linfonodi accumulano gli antigeni, permettendo che in essi si instaurino i processi della risposta immunitaria adattativa, e filtrano inoltre la linfa prima del suo riversamento nel sangue (1).

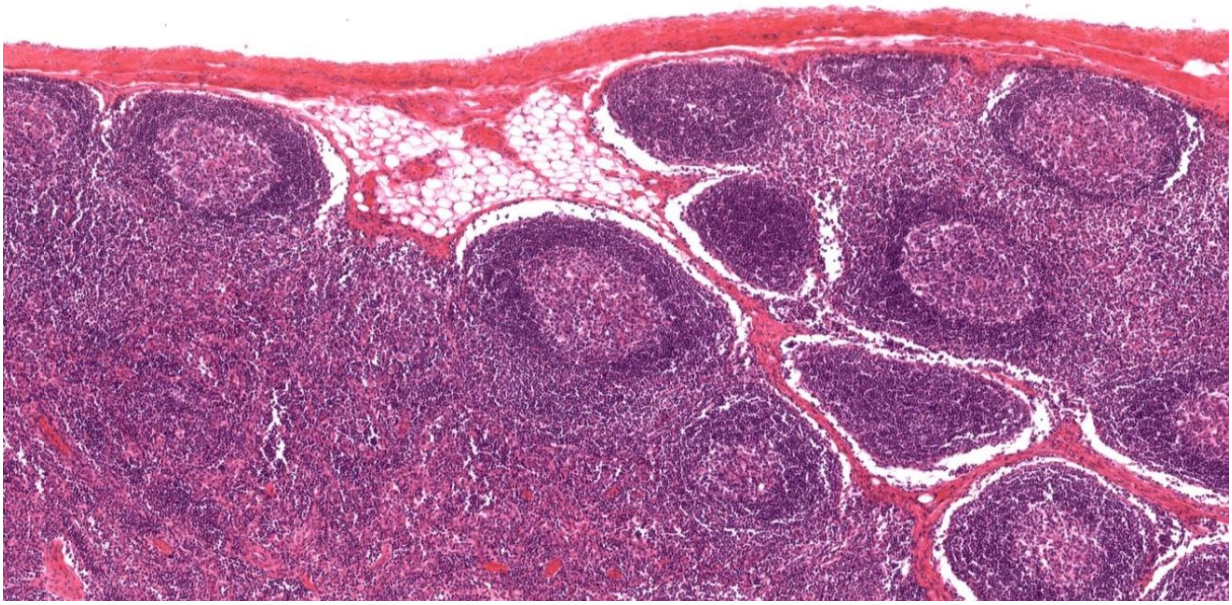

Figura 4. Linfonodo (7)**.** Sezione istologica di linfonodo. In alto, in colore rosso chiaro, appare la capsula fibrosa dalla quale, vicino al centro dell'immagine, si distacca una trabecola che attraversa l'organo. Ben evidenti sono i follicoli della corticale, alcuni caratterizzati da un centro germinativo, più chiaro rispetto alla corona mantellare circostante. A circondare e separare tra loro i follicoli vi sono le aree di linfociti T della paracorticale, più chiare rispetto alla zona mantellare dei follicoli. In basso a sinistra si individua la midollare, di colore rosato-violaceo. Il sottile spazio tra la capsula e i follicoli corrisponde al seno sottocapsulare, mentre i canali presenti tra la trabecola e i follicoli rappresentano i seni corticali.

Milza

La milza è un organo impari collocato nell'ipocondrio sinistro, ed è la principale sede delle risposte specifiche ad antigeni presenti nel circolo sanguigno (1). Come i linfonodi, la milza è rivestita da una capsula fibrosa. L'arteria splenica, che perfora la capsula a livello dell'ilo, si sfiocca all'interno dell'organo in vasi di calibro progressivamente minore, fino alle arteriole centrali. Queste sono circondate lungo il loro decorso da manicotti linfoidi periarteriolari (PALS), a cui sono annessi dei follicoli linfoidi che talvolta includono un centro germinativo. Queste strutture, chiamate collettivamente polpa bianca, sono circondate da un sottile strato di linfociti e macrofagi, la zona marginale. Le arteriole centrali sfociano nei seni marginali, ossia particolari canali vascolari anastomotici, attorno ai quali si trovano abbondanti macrofagi, cellule dendritiche, scarsi linfociti, organizzati nella polpa rossa (1). In ultima sintesi, dunque, la polpa bianca è organizzata in nuclei isolati, interamente inglobati dalla polpa rossa; ogni isolotto di polpa bianca è separato dalla polpa rossa circostante dalla zona marginale e dal seno marginale (1). In alcuni animali, tra cui l'uomo, il cane, ed il ratto, esiste un ulteriore canale vascolare, il seno cavernoso perimarginale, posto in continuità con la zona marginale e con altre strutture vascolari (9). Il seno marginale è però risultato assente nella milza umana (10). Vi sono anche altre rilevanti differenze anatomiche tra la milza umana e quella dei roditori. Nell'uomo, invero, la zona marginale è suddivisa in una zona marginale interna e una esterna (11). Il confine tra le due aree è delimitato da particolari fibroblasti (11). Inoltre, la zona marginale umana è separata dalla polpa rossa da una zona perifollicolare (12). Quest'ultima è abitata da linfociti T e B e contiene sia spazi vascolari privi di endotelio, sia capillari. Tali capillari sono circondati da manicotti di marcofagi positivi alla sialoadesina, i quali non si osservano invece nel ratto (12). Il seno marginale, la zona marginale e il seno cavernoso perimarginale drenano nei vasi venosi della polpa rossa (9). In alcune specie, come il topo, il sangue è raccolto da venule, mentre in altri animali, tra cui l'uomo, il gatto, ed il leone, si trovano i sinusoidi venosi, ampiamente anastomotici (13). Analogamente ai linfonodi, vi è una segregazione delle cellule nelle varie aree appena considerate (1). I follicoli contengono cellule B, mentre i linfociti T popolano i manicotti periarteriolari, con una maggioranza di T *helper* $CD4^+$ rispetto ai T $CD8^+$. La zona marginale include macrofagi, linfociti T *helper* $CD4^+$ e linfociti B specializzati detti linfociti B della zona marginale. L'attivazione dei linfociti B si verifica nella zona di giunzione tra i manicotti del PALS e i follicoli. Le cellule B si localizzano in centri germinativi o nella polpa rossa. I macrofagi della polpa rossa rappresentano il più importante sito di fagocitosi di materiale particolato, soprattutto microrganismi opsonizzati (1).

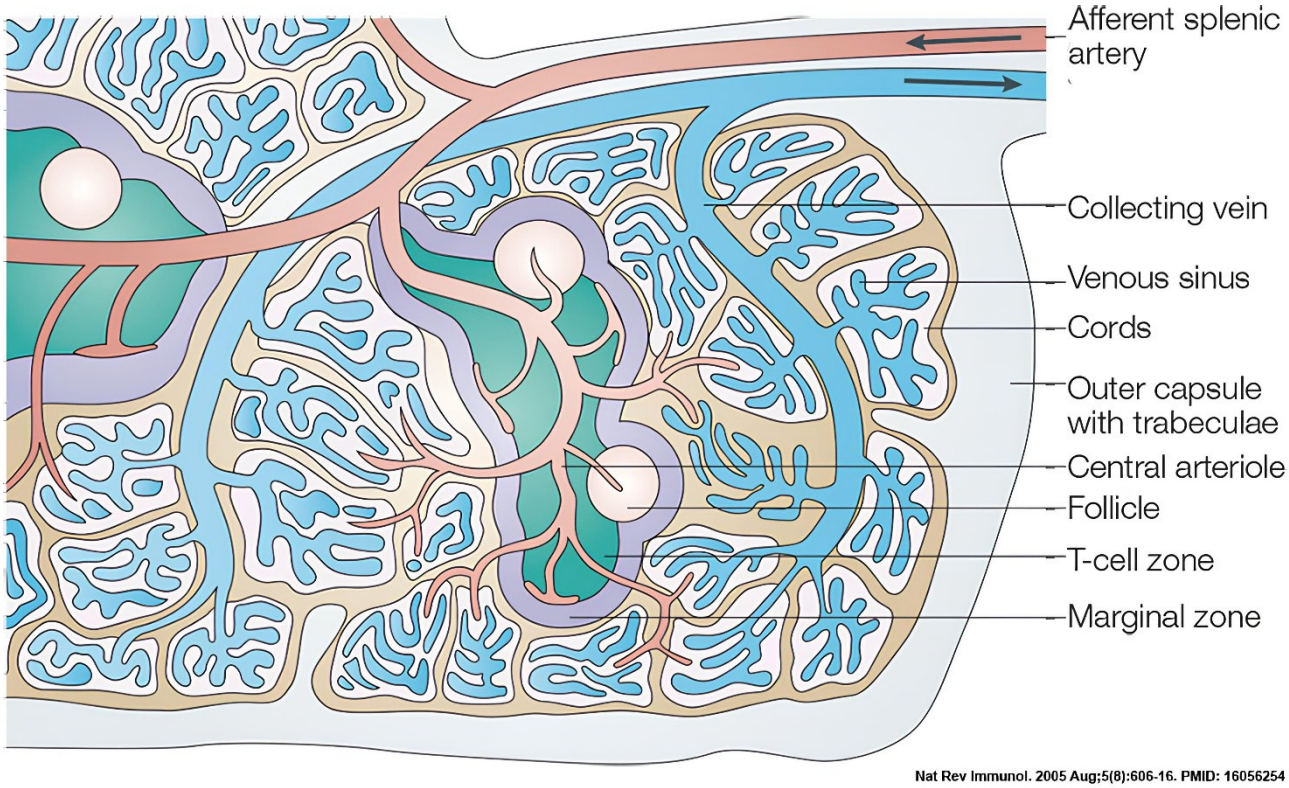

Figura 5. Anatomia microscopica della milza (14)**.** Il parenchima splenico è organizzato attorno alla microcircolazione dell'organo. L'albero arterioso, rappresentato in rosso corallo, include le arteriole centrali, immerse nei manicotti del PALS, colorati in verde smeraldo. L'albero venoso, raffigurato in turchese, inizia con i seni venosi, mentre la zona marginale, in indaco, segna la separazione tra la polpa bianca e la polpa rossa.

Tessuto linfoide associato alla cute (SALT)

La cute è una sede di ingresso importante per agenti estranei e di inizio delle risposte immunitarie. Nell'epidermide sono disseminati linfociti intraepidermici e cellule di Langerhans (1). Un tempo considerate cellule dendritiche, le cellule di Langerhans sono oggi riconosciute come appartenenti al lignaggio dei macrofagi (15). Esse mostrano tuttavia molti aspetti in comune con le cellule dendritiche (15). Infatti, le cellule di Langerhans sono presenti in forma immatura a livello epidermico, ove formano collettivamente un reticolo grazie ai lunghi prolungamenti di cui sono dotate (1). Captato un antigene introdotto in seguito a una ferita cutanea o a una vaccinazione, le cellule di Langerhans retraggono i dendriti e migrano ai linfonodi tramite i capillari linfatici del derma. I linfociti intraepidermici sono prevalentemente cellule T $CD8^+$ e hanno un repertorio di recettori per l'antigene meno vario rispetto a molti altri distretti. Il derma contiene una quantità di linfociti maggiore rispetto all'epidermide. Si tratta di cellule T sia del fenotipo $CD4^+$ sia $CD8^+$, riscontrabili soprattutto in sede perivascolare. Il derma ha inoltre un significativo contenuto di macrofagi (1).

Tessuto linfoide associato alle mucose (MALT)

Le mucose rappresentano un'importante barriera all'ingresso di microrganismi a cui esse sono esposte. Per questo la mucosa e la sottomucosa sono colonizzate da linfociti e cellule accessorie, ivi presenti per garantire una risposta immunitaria ad antigeni che possono

introdursi nell'organismo attraverso le mucose (1). Gli esempi probabilmente più emblematici di MALT sono probabilmente l'anello linfatico di Waldeyer e le placche di Peyer intestinali. Alle placche di Peyer, istologicamente e funzionalmente analoghe al parenchima linfonodale, si farà più volte riferimento nella presente trattazione, anche se il MALT verrà trattato estesamente solo alla fine della Sezione introduttiva.

Tessuto linfoide terziario

Il tessuto linfoide terziario è un tessuto linfoide ectopico che si forma a livello di organi affetti da patologie infiammatorie croniche, tipicamente in sede perivascolare (16). Come gli organi linfoidi secondari, il tessuto linfoide terziario è principalmente costituito da linfociti, con il supporto strutturale di fibroblasti specializzati. Si manifesta in aggregati di variabile morfologia, partendo da semplici raggruppamenti poco coesi di cellule B e T, arrivando a strutture ben più organizzate caratterizzate da segregazione dei linfociti T e B in aree separate. Le aree B possono ospitare un centro germinativo. Si riscontra anche la presenza delle venule ad endotelio alto (HEV). Sebbene la loro anatomia rammenti il parenchima linfonodale, gli aggregati linfoidi terziari non sono circondati da una capsula. Perciò, tali formazioni sono direttamente esposte agli antigeni. Le patologie in cui si può assistere alla formazione di tessuto linfoide terziario includono tumori maligni, infezioni, malattie autoimmuni e malattie cronico-degenerative legate all'età. Nelle neoplasie e nelle infezioni, la presenza del tessuto linfoide terziario è associata ad un miglioramento della prognosi, mentre nei fenomeni autoimmuni e cronico-degenerativi, ad un suo peggioramento (16). Esempi di tessuto linfoide terziario si riscontrano a livello renale in patologie tra cui il rigetto di trapianto di rene e il lupus eritematoso sistemico (LES) (17–21); nel LES, il tessuto linfoide terziario si osserva anche nel sistema nervoso centrale (22). La formazione di tessuti linfoidi terziari può anche essere indipendente da malattie ed essere invece correlata alla senescenza (16), come accade nel fegato e nella milza (23–25).

RICONOSCIMENTO SPECIFICO DELL'ANTIGENE

Il riconoscimento specifico di un antigene da parte del sistema immunitario è mediato essenzialmente da tre molecole, ossia le proteine del Complesso Maggiore di Istocompatibilità, il recettore per l'antigene dei linfociti T e gli anticorpi. Queste molecole rendono possibile la transizione tra l'immunità innata come unico iniziale mezzo di difesa all'infezione, e l'inizio delle risposte adattative (1).

ANTICORPI (Immunoglobuline)

Tra le molecole implicate nel riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti, gli anticorpi sono quelle che presentano il maggior grado di diversificazione, la maggior capacità di discriminare tra i diversi antigeni, e la più elevata affinità per gli antigeni (1). Gli anticorpi, inoltre, non prendono parte solo al riconoscimento, ma anche alla fase effettrice dell'immunità. Le uniche cellule in grado di produrre anticorpi sono i linfociti B, i quali li sintetizzano in due diverse forme. La forma di membrana svolge la funzione di recettore per l'antigene, dando

luogo alla risposta delle cellule B. Tale stimolazione antigenica avvia la produzione di un grande quantitativo di anticorpi in forma secreta, che partecipano ai meccanismi effettori legandosi all'antigene e determinandone, mediante diversi fenomeni, l'eliminazione. Gli anticorpi sono distribuiti nel plasma, nelle secrezioni mucose e, in minori concentrazioni, nei fluidi extracellulari. Le forme secrete degli anticorpi si legano alle membrane dei fagociti mononucleati, dei mastociti e delle cellule NK, grazie a particolari recettori espressi da queste cellule. Gli anticorpi prodotti da cloni diversi di linfociti B hanno significativa variabilità nelle regioni di legame antigenico, ma presentano aspetti strutturali identici. Sono proprio queste caratteristiche a permettere la generazione di un numero elevatissimo di anticorpi diversi, pur mantenendo costanti le funzioni effettrici che da essi dipendono, oltre ai caratteri fisico-chimici, simili per i differenti anticorpi. Le funzioni effettrici dell'anticorpo sono infatti mediate da regioni strutturalmente separate da quelle che attuano il legame all'antigene. Ogni molecola anticorpale presenta una struttura simmetrica, formata da due catene pesanti, tra loro identiche e dal peso di circa 55 o 70 kDa ciascuna, e da due catene leggere, anch'esse uguali fra loro, e del peso di circa 24 kDa ciascuna. Entrambi i tipi di catena includono una serie di segmenti omologhi in grado di ripiegarsi su sé stessi in una struttura globulare, chiamata dominio immunoglobulinico. Tale struttura è formata da due foglietti β planari sovrapposti, a loro volta composti da poche unità di nastri polipeptidici a disposizione antiparallela. Domini immunoglobulinici si riscontrano anche in altre proteine aventi un ruolo nel sistema immunitario, che costituiscono la superfamiglia delle Ig, un macroinsieme che comprende, oltre gli anticorpi, molte altre molecole. Ciononostante, il termine "immunoglobulina" è molto spesso utiizzato come sinonimo di anticorpo. Le catene pesanti e quelle leggere possiedono entrambe una regione variabile, N-terminale, ed una costante, C-terminale. Per le catene leggere si ha un dominio Ig per la porzione variabile e uno per la regione costante. Le catene pesanti manifestano una regione variabile comprendente un solo dominio Ig, mentre la loro regione costante può comporsi di 3 o 4 domini Ig, con il numero esatto che varia a seconda dall'isotipo anticorpale. In un'immunoglobulina correttamente ripiegata e assemblata vi è l'accostamento tra le regioni variabili delle catene leggere e quelle delle catene pesanti a formare una superficie in grado di interagire con un ben determinato epitopo antigenico. In particolare, in ogni anticorpo esistono due identici siti di legame per l'antigene, essendo che le coppie catena pesante - catena leggera sono due nella struttura anticorpale. Il ruolo effettore dell'immunoglobulina è legato alla sola regione costante delle catene pesanti, mentre la regione costante delle catene leggere ha uno scopo puramente strutturale. Le regioni variabili di entrambi i tipi di catene contengono tre brevi parti, denominate regioni ipervariabili, oppure CDR (*Complementarity-Determining Regions*), in cui si riscontra la maggiore variabilità di sequenza tra tutti gli anticorpi. I segmenti ipervariabili, lunghi circa 10 amminoacidi, sono intervallati da sequenze più conservate, e sono numerati CDR1, CDR2 e CDR3 partendo dall'estremità N-terminale delle catene. I CDR di una catena leggera sono allineati ai rispettivi corrispondenti della catena pesante a cui essa è legata, formando uno spazio complementare all'antigene. La variabilità di sequenza amminoacidica tra i CDR di anticorpi diversi produce combinazioni di residui amminoacidici a livello della superficie di legame uniche per ogni anticorpo, con la possibilità di ottenere il notevole differenziamento del repertorio anticorpale che si osserva. Nello specifico, le regioni cornice che si inframezzano alle regioni ipervariabili sono responsabili del corretto ripiegamento delle regioni variabili in un dominio Ig, grazie alla loro ben più costante sequenza; le regioni ipervariabili dettano invece la specificità di un anticorpo per un dato antigene. Il contatto antigene-anticorpo più esteso si ha a livello di CDR3, regione che possiede il grado maggiore di variabilità. Degno di nota, altresì, è il fatto che pure le regioni cornice stabiliscono un'interazione molecolare con l'antigene (1).

Isotipi e sottoclassi anticorpali

Gli anticorpi sono classificati in isotipi in base alla struttura delle catene pesanti (1). Gli isotipi anticorpali sono chiamati IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Gli isotipi IgA e IgG sono ulteriormente suddivisi in sottoclassi, in particolare IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Gli anticorpi che appartengono ad uno stesso isotipo, o sottoclasse, a seconda del caso specifico, possiedono la sequenza amminoacidica della regione costante delle catene pesanti sostanzialmente uguale. Tale sequenza invece differisce in anticorpi rientranti in un altro isotipo o sottoclasse. Le catene pesanti vengono chiamate con la lettera dell'alfabeto greco corrispondente all'isotipo, con un eventuale numero ad indicarne, se del caso, la rispettiva sottoclasse. Le catene pesanti delle IgE e delle IgM comprendono complessivamente 5 domini Ig, di cui uno costituente la regione variabile e 4 formanti la regione costante. Le catene pesanti delle IgA, IgD e IgG hanno invece 4 domini Ig, di cui 3 formano la regione costante. Tali domini vengono numerati a partire dall'estremità N-terminale in C_H1, C_H2, etc. La diversità tra i vari isotipi e sottoclassi risiede nella composizione delle regioni costanti delle catene pesanti, che differenzia le funzioni effettrici svolte da ogni isotipo e sottoclasse. La flessibilità della molecola anticorpale permette all'Ig di legarsi a due o più epitopi identici di antigeni multivalenti. Tale flessibilità è dovuta principalmente ad una regione cerniera a livello delle catene pesanti tra i domini C_H1 e C_H2, di lunghezza variabile tra i diversi isotipi e sottoclassi, ma anche alla torsione che si può verificare tra domini V_H e C_H1 delle catene pesanti. La regione cerniera fa parte di tutti gli isotipi, fatta eccezione per le IgE. Per le catene leggere si riconoscono due isotipi, chiamati κ (kappa) e λ (lambda). Questi due isotipi non presentano differenze funzionali, in divergenza da ciò che avviene con le catene pesanti. In uno stesso anticorpo le catene leggere sono entrambe dello stesso isotipo. Tra i due isotipi esiste una certa omologia sia a livello delle regioni costanti, chiamate rispettivamente Cκ e Cλ, sia nelle regioni variabili, dette Vκ e Vλ. Le regioni Cκ e Cλ si arrangiano in un solo dominio Ig. Degli anticorpi espressi nell'uomo, il 60% esprime catene leggere κ, mentre il restante 40% catene λ. Neoplasie dei linfociti B caratterizzate dall'espansione di un clone alterano questo rapporto. Nel topo, il rapporto κ/λ è di circa 10, ben più elevato di quello umano (1).

Anticorpi secreti e anticorpi di membrana: differenze strutturali

Le forme di membrana degli anticorpi e quelle secrete differiscono per la sequenza amminoacidica C-terminale dell'ultimo dominio C_H (1). Nelle forme secrete, questa regione termina con una serie di residui carichi, mentre nelle forme di membrana si riscontra una sequenza di 26 amminoacidi idrofobici che si continua con una catena di residui basici C-terminale. La regione idrofobica si ripiega ad α-elica a costituire il dominio transmembrana, mentre gli amminoacidi basici sono intracitoplasmatici ed interagiscono con le teste polari dei fosfolipidi dello strato interno della membrana. Il dominio intracitoplasmatico delle IgD e delle IgM è molto più breve di quello presente in IgE e IgG. Le forme di membrana si trovano sempre allo stato monomerico; anche le forme secrete delle IgG e delle IgE sono monomeriche. Contrariamente, le unità anticorpali secrete di IgA e IgM sono assemblate covalentemente in complessi multimerici. Le IgA sono secrete sotto forma di dimeri, monomeri e trimeri. Le IgM secrete si osservano solo in forma pentamerica. L'interazione tra queste avviene a livello di sequenze di coda, presenti all'estremità C-terminale delle catene pesanti α

e μ. A stabilizzare maggiormente tali complessi è la catena J, un polipeptide di 15 kDa che forma ponti disolfuro con le sequenze di coda (1).

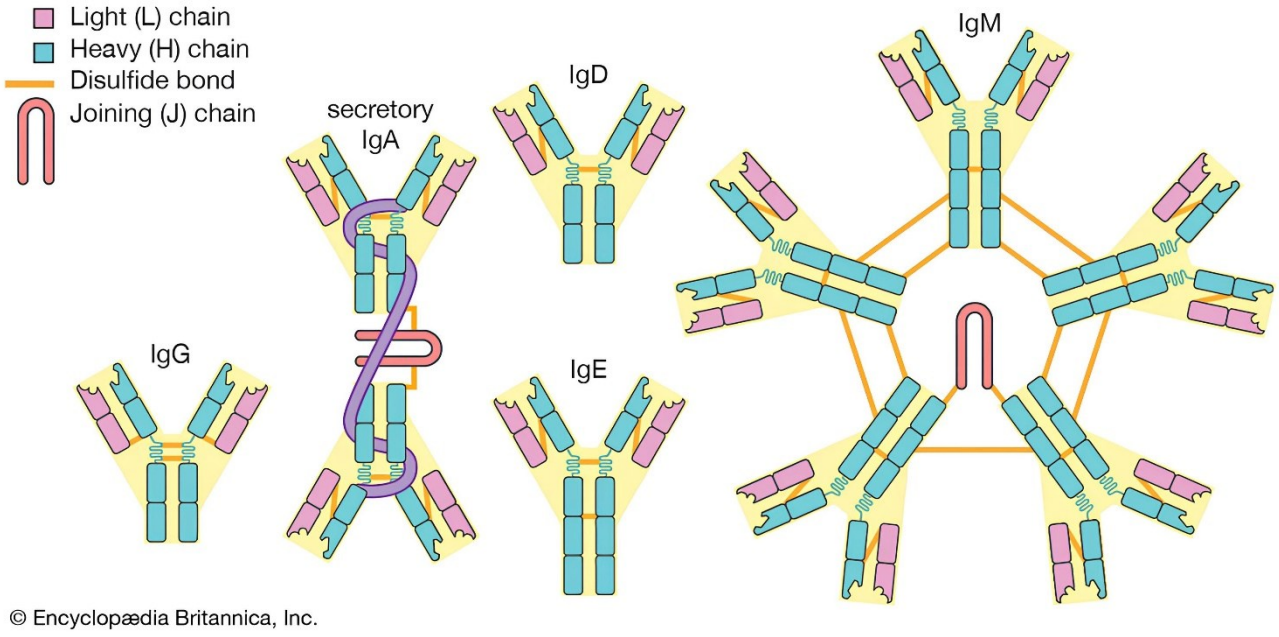

Figura 6. Strutture monomeriche e polimeriche degli anticorpi (26)**.** Si noti la presenza della catena J nel pentamero di IgM secretorie e nel dimero di IgA secretorie.

Assemblaggio strutturale delle catene nelle molecole di anticorpo

Ciascuna catena leggera è legata ad una pesante in modo che le regioni V_H e V_L si allineino a formare la superficie di legame con l'antigene (1). Le due catene sono unite da un ponte disolfuro tra l'estremità C-terminale della catena leggera e il dominio C_H1, con l'aggiunta di interazioni non covalenti tra i domini V_H e V_L e tra C_H1 e C_L. Le catene pesanti sono tra loro connesse da ponti disolfuro che nelle IgG si trovano a livello delle regioni Cγ2 in prossimità della regione cerniera. Anche legami non covalenti possono intervenire nell'appaiamento tra le catene pesanti (1). Esperimenti svolti trattando IgG di coniglio con papaina in condizioni di proteolisi limitata hanno prodotto tre frammenti (27). Due di questi, identici fra loro, sono costituiti da una catena leggera legata alla porzione V_H-C_H1 di una catena pesante e sono noti come Fab (*Fragment, antigen binding*) poiché conservano la capacità di legare l'antigene, comprendendo infatti la tasca di legame nella sua totalità (1). L'altro frammento, definito Fc (*Fragment, crystallizable*), è formato dai domini C_H2 e C_H3 delle catene pesanti uniti covalentemente (1). Lo stesso trattamento su anticorpi di altri isotipi e di altre specie non porterebbe allo stesso risultato (1), ma l'esperimento ha permesso di identificare l'organizzazione strutturale e funzionale di tutti gli anticorpi, anche in relazione alla separazione spaziale tra le funzioni di legame e quelle effettrici (27).

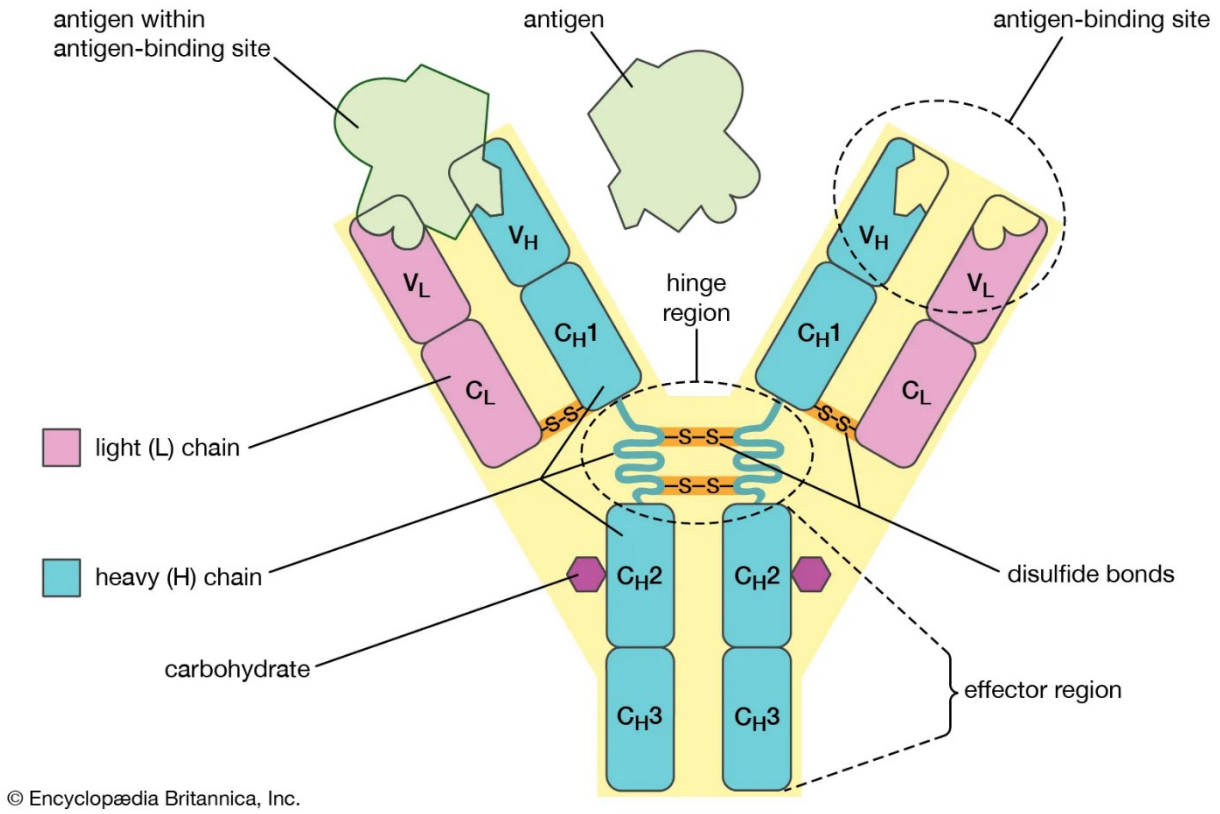

Figura 7. Schema strutturale di un anticorpo (26)**.** Si osservino i ponti disolfuro che uniscono tra loro le catene pesanti a livello della regione cerniera e quelli che uniscono ciascuna catena pesante alla rispettiva catena leggera. Si noti inoltre il sito legante l'antigene, ottenuto dall'appaiamento delle regioni variabili delle catene pesanti e leggere.

Processo biologico di sintesi degli anticorpi

La produzione anticorpale nei linfociti B implica la sintesi delle catene pesanti e leggere a livello ribosomiale, il loro assemblaggio covalente e la N-glicosilazione nel reticolo endoplasmatico, la processazione dei carboidrati nell'apparato di Golgi e, infine, il trasporto verso la membrana attraverso vescicole e l'esocitosi (1). L'immunoglobulina, a seconda della forma, può rimanere ancorata alla membrana oppure diffondere nei liquidi biologici (1).

Aspetti biochimici del legame anticorpo-antigene

L'interazione tra anticorpo e antigene comporta un legame non covalente e reversibile, in particolare caratterizzato da legami a idrogeno, forze di Van der Waals, interazioni elettrostatiche ed idrofobiche (1). L'affinità di un anticorpo misura la forza di legame tra il singolo sito combinatorio dell'immunoglobulina e l'epitopo. Essa è espressa come costante di dissociazione, Kd, che esprime la concentrazione di antigene necessaria ad occupare la metà dei siti combinatori in una sospensione anticorpale. Normalmente questa oscilla tra i 10^{-7} M e i 10^{-11} M. Osservando che un anticorpo possiede due siti combinatori nelle IgG e IgE e molti più siti negli anticorpi multimerici, se ne deduce che le immunoglobuline possono legare più di un'unità epitopica in un antigene polivalente, soprattutto considerata la flessibilità strutturale. Una IgM in forma secreta può arrivare a legare fino a 10 epitopi, con un aumento significativo

della forza di interazione rispetto ad un anticorpo monomerico di pari affinità. La forza complessiva di legame dell'anticorpo è chiamata avidità, e il suo valore cresce ad ogni sito combinatorio occupato (1).

Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC)

I linfociti T riconoscono l'antigene in maniera completamente diversa rispetto ai B (1). Perché i linfociti T possano attuare il riconoscimento, l'antigene va presentato dalle cellule attraverso proteine di membrana facenti parte del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC). Il recettore della cellula T è in grado di riconoscere un frammento proteico solo se questo è legato ad un complesso MHC. Vi sono due tipi di molecole MHC, note come MHC di classe I e MHC di classe II. L'MHC I espone sulla superficie cellulare antigeni intracellulari citosolici e li presenta ai linfociti T a fenotipo CD8+. L'MHC II, d'altra parte, complessa frammenti di antigeni proteici provenienti da materiale fagocitato, presentandoli selettivamente ai linfociti T CD4+. Alle molecole MHC umane viene dato il nome di antigeni leucocitari umani (HLA). I loci genetici HLA sono situati in una regione del cromosoma 6. I geni HLA-A, HLA-B e HLA-C sono noti come geni MHC di classe I, mentre i geni HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR sono chiamati geni MHC di classe II. Queste due classi di geni codificano per proteine funzionalmente distinte ma tra loro omologhe. I geni MHC sono altamente polimorfi ed espressi in regime di codominanza: ogni individuo esprime entrambi gli alleli. Ad ognuno di questi alleli è assegnato un numero, e la lista degli alleli MHC presenti su ciascun cromosoma è definita aplotipo MHC. Alcune forme alleliche dei geni MHC vengono ereditate congiuntamente con una frequenza tale da ritenere poco verosimile l'evento casuale; questo fenomeno prende il nome di *linkage disequilibrium* (1).

Basi biochimiche delle molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità

Le molecole MHC sono essenzialmente costituite da una tasca di legame per il peptide, due domini Ig, uno o due domini transmembrana di ancoraggio alla cellula e una o due porzioni C-terminali intracitoplasmatiche (1). La tasca di legame del peptide è formata da un basamento di foglietto β e due α-eliche laterali. Queste ultime formano anche il contatto con il recettore dei linfociti T. Gli amminoacidi variabili a causa del polimorfismo genetico sono concentrati in questa regione. I due domini Ig, non polimorfi, legano i co-recettori CD4 o CD8 a seconda della molecola. In particolare, i recettori $CD4^+$ legano solo le MHC II e i $CD8^+$ si appaiano esclusivamente alle MHC I (1).

Molecole MHC di classe I

Le molecole MHC I sono eterotrimeri composti da una catena α, codificata dai geni MHC, dal peptide antigenico, e da una catena di β2-microglobulina, molecola non polimorfa il cui gene codificante mappa nel cromosoma 15 (1). La presenza di tutti i tre componenti è essenziale per il mantenimento del complesso a livello di membrana. Gran parte della lunghezza della catena α prende posto all'esterno della cellula. La porzione N-terminale si ripiega in due

domini, α1 e α2, ciascuno dei quali costituisce una delle pareti e metà del basamento della tasca per il peptide. Nei domini α1 e α2 risiedono gli amminoacidi polimorfi dell'MHC I. La tasca ha dimensioni adatte ad ospitare un peptide di 8-11 amminoacidi. La catena si continua con il dominio α3, ripiegato in un motivo Ig. Tale regione contiene sequenze atte ad interagire con il CD8. Seguono il dominio transmembrana, di 25 amminoacidi, e quello intracitoplasmatico C-terminale, di 30 amminoacidi. Ogni individuo esprime sei distinte molecole MHC di classe I: una per ogni allele HLA-A, HLA-B, HLA-C di entrambi i cromosomi. La β2-microglobulina è ripiegata in un dominio Ig che interagisce in modo non covalente con il dominio α3 e non possiede un dominio transmembrana. I legami tra la tasca e il peptide e tra la catena α e la β2-microglobulina si rafforzano vicendevolmente (1).

Molecole MHC di classe II

Le molecole MHC di classe II sono eterotrimeri formati dal peptide antigenico e da due polipeptidi appaiati con legami non covalenti, entrambi codificati da geni MHC (1). Prendono i nomi di catena α, di circa 32-34 kDa, e catena β, di circa 29-32 kDa. Le parti N-terminali di entrambe le catene sono ripiegate nei domini α1 e β1, ciascuno dei quali compone una parete e metà del fondale della tasca per il peptide. La loro congiunzione dà forma a tale spazio interno. In α1 e β1 si trovano gli amminoacidi polimorfi delle molecole MHC II. Diversamente dalle molecole MHC I, le estremità della tasca sono aperte, e la tasca può contenere peptidi di lunghezza anche superiore ai 30 amminoacidi. Le catene si continuano con i domini α2 e β2, domini immunoglobulinici non polimorfi. A livello di β2 vi è una regione di legame per il CD4. Alle porzioni α2 e β2 segue una breve regione che le connette ad un dominio transmembrana di 25 amminoacidi. La porzione intracitoplasmatica di entrambe le catene comprende un tratto iniziale di amminoacidi basici e un apice C-terminale di residui idrofili. Le molecole MHC di classe II neosintetizzate sono associate ad una proteina non polimorfa, la catena invariante. Questa regola il traffico intracellulare delle molecole MHC II. Le catene α codificate da un locus HLA tendono ad accoppiarsi preferenzialmente con catene β derivanti dallo stesso locus, anche se si possono osservare appaiamenti eterologhi, ad esempio tra una catena α dell'HLA-DP di un cromosoma con la β dell'HLA-DP dell'altro cromosoma. Per tali ragioni il numero di molecole MHC II diverse espresse da un individuo eterozigote è di 10-20 (1).

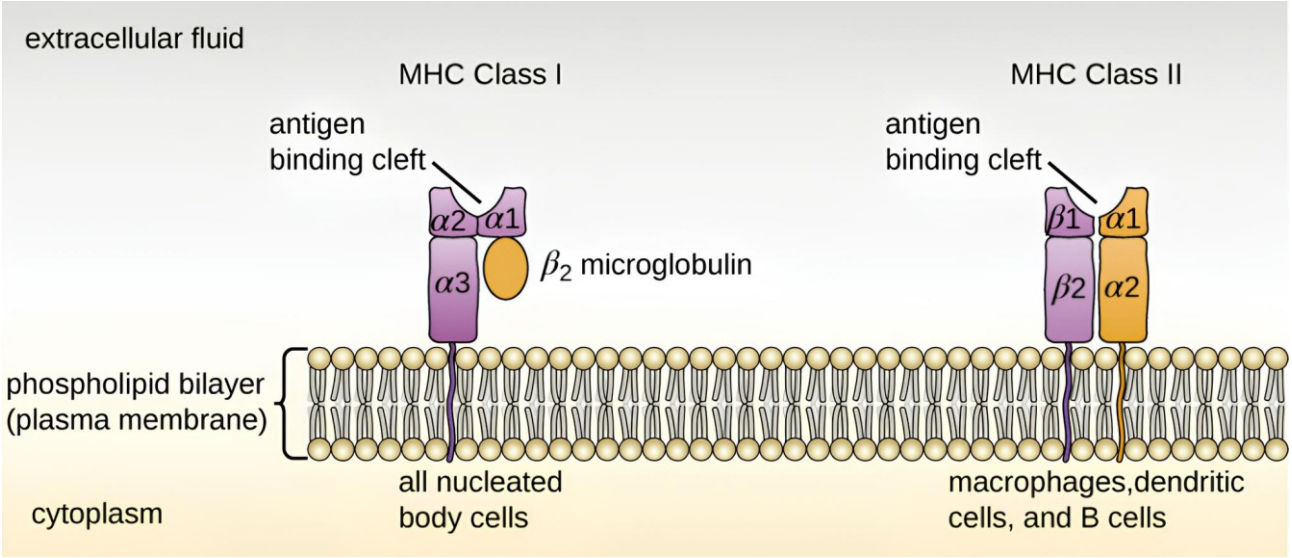

Figura 8. Schema di struttura delle molecole MHC I e II (28)**.** Si osservi la posizione della tasca di legame in ciascuno dei due complessi.

Aspetti biochimici del legame tra molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità e peptidi antigenici

Il peptide antigenico che le molecole MHC espongono è trattenuto nella tasca da interazioni non covalenti (1). Il peptide è dotato di uno o due residui "àncora", coinvolti in interazioni idrofobiche con amminoacidi dei foglietti β del basamento della tasca. I residui àncora possono essere situati a metà o a un'estremità del peptide. Al legame tra peptidi e molecole MHC contribuiscono inoltre interazioni elettrostatiche e ponti a idrogeno tra residui del peptide e le due α-eliche che costituiscono le pareti laterali. I peptidi che si legano a molecole MHC di classe I contengono spesso residui basici o idrofobici all'estremità C-terminale con una rilevante importanza nel legame con la tasca. Grazie al polimorfismo degli amminoacidi della tasca, le molecole MHC codificate da alleli diversi sono in grado di coniugare peptidi differenti. Ad essere riconosciuta in modo altamente specifico dal recettore dei linfociti T è solo la porzione del peptide esposta all'imboccatura della tasca. I residui riconosciuti dal recettore linfocitario sono distinti da quelli che interagiscono con gli amminoacidi della tasca. Perché si attivi la risposta T, tuttavia, è anche necessario che il recettore delle cellule T si leghi a regioni polimorfe delle due α-eliche delle pareti della tasca. Ogni molecola MHC è in grado di legarsi a peptidi diversi a seconda delle esigenze. Per questo motivo i peptidi che si legano ad una data forma allelica di molecole MHC devono presentare delle caratteristiche in comune in merito a strutture complementari con la tasca di tale forma allelica. Ancor prima delle caratteristiche chimico-fisiche, la lunghezza della sequenza discrimina la classe della molecola MHC a cui il peptide si può legare. Infatti, le molecole di classe I riescono ad accogliere peptidi di minor lunghezza rispetto a quelli che possono inserirsi nelle molecole di classe II. Tra peptidi antigenici e molecole MHC sussiste un'interazione saturabile a bassa affinità, con Kd attorno a 10^{-6} M. La kd è il rapporto tra il tasso di associazione (t_{on}) e il tasso di dissociazione (t_{off}). Il ton tra peptide e molecola MHC è basso e il t_{off} è ancora inferiore. Ne consegue un tempo di dissociazione molto lungo, da molte ore a giorni, sufficiente affinché il linfocita T intercetti il complesso MHC-peptide. Le molecole MHC non veicolano soltanto peptidi eterologhi (*non-self*), ma anche autologhi (*self*). Ciononostante, la fine specificità del

riconoscimento dei peptidi da parte dei recettori delle cellule T e la tolleranza al *self* dei linfociti T impediscono un'attivazione della risposta T a peptidi autologhi (1).

Altri geni mappanti nel locus MHC

Il locus MHC è situato sul braccio corto del cromosoma 6, con i geni delle molecole di classe I disposti verso il telomero e quelli delle molecole di classe II verso il centromero (1). Esso codifica non solo per le molecole MHC, ma per la gran parte delle proteine responsabili della processazione intracellulare dell'antigene. Nel locus di classe II si trovano due geni codificanti per un trasportatore eterodimerico chiamato TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*). Esso trasporta peptidi nel reticolo endoplasmatico per farli legare a molecole MHC di classe I. L'MHC contiene anche i geni codificanti il proteasoma, complesso proteico che degrada proteine nel citoplasma ricavandone i peptidi da accoppiare alle molecole MHC di classe I. I due geni HLA-DMA e HLA-DMB codificano la proteina HLA-DM, coinvolta nel legame dei peptidi alle MHC di classe II. Tra i geni di classe I e quelli di classe II si trova un locus chiamato "MHC di classe III". I geni in esso contenuti codificano alcune proteine del complemento, tre citochine, e alcune *heat shock proteins* (HSP), prodotte in risposta a stress. Tra i geni HLA-C e HLA-A sono compresi geni chiamati "geni di tipo classe I", i quali presentano somiglianze con i geni di classe I pur manifestando scarso polimorfismo. Tra questi figurano geni codificanti HLA-G, una proteina con un ruolo nel riconoscimento antigenico da parte di cellule NK, e le molecole di classe IB, espresse assieme alla β2-microglobulina. Molte altre proteine codificate da geni di tipo classe I hanno un ruolo sconosciuto (1).

Profili di espressione delle molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità

Le molecole MHC di classe I sono espresse da tutte le cellule nucleate (1). Tale fenomeno si riconduce al fatto che esse attivano selettivamente linfociti T $CD8^+$, i quali presentano nella maggior parte dei casi attività citotossica. Questo permette alle cellule nucleate infettate da parassiti intracellulari, come ad esempio i virus, di essere soppresse, in modo da contenere l'infezione. Citochine come gli interferoni α, β e γ, fattore di necrosi tumorale (TNF) e linfotossina incrementano l'espressione di molecole MHC I nella maggior parte delle cellule. Le molecole MHC di classe II sono invece appannaggio esclusivo di macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B e pochi altri tipi cellulari. Di conseguenza, le molecole di classe II rappresentano il sistema ideale per la presentazione di microrganismi extracellulari. Il profilo espressivo è così ristretto perché le molecole di classe II sono riconosciute dai linfociti T $CD4^+$, la gran parte dei quali ha un'attività *helper*. I linfociti T *helper* hanno il compito di stimolare l'attività fagocitica dei macrofagi e la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B, necessitando quindi di interagire con pochi tipi cellulari. Per tale motivo, l'espressione di molecole MHC II è limitata a tali cellule. Nei monociti, nei macrofagi e nelle cellule endoteliali vascolari, la principale citochina incrementante l'espressione di MHC di classe II è l'interferone-γ. In assenza di questa stimolazione, tali cellule esprimono livelli di MHC II molto bassi. Le cellule dendritiche aumentano gradualmente il proprio numero molecole di classe II, principalmente grazie alla stimolazione da parte del TNF. I linfociti B, che esprimono costitutivamente le MHC di classe II, ne incrementano la produzione in risposta all'IL-4.

Nell'uomo, anche i linfociti T, dopo la loro attivazione, esprimono molecole MHC di classe II. Tale fenomeno non si riscontra però nel topo. Le citochine incrementano la sintesi e l'espressione di molecole MHC aumentando il tasso di trascrizione dei relativi geni. Nello specifico, le citochine sono in grado di attivare dei fattori di trascrizione, e questi si legano a sequenze regolatrici dei promotori dei geni MHC. Nel caso delle MHC di classe II, molti fattori di trascrizione possono associarsi ad una proteina nota come CIITA (*Class II Transcription Activator*). Il complesso che ne risulta si lega al promotore di classe II e favorisce la trascrizione genica. CIITA, la cui espressione è indotta dall'interferone-γ, è il principale elemento regolatorio per l'espressione di MHC classe II. Altre proteine coinvolte nella presentazione dell'antigene, la cui trascrizione incrementa in risposta all'interferone-γ, sono β2-microglobulina, proteasoma e TAP (1).

Cellule presentanti l'antigene (APC)

Le cellule presentanti l'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC) ai linfociti T $CD4^+$ sono in grado di endocitare l'antigene, processarlo, ed esporlo in complessi MHC di classe II (1). I fagociti mononucleati, le cellule dendritiche e i linfociti B esprimono costitutivamente MHC II e sono classificati come APC professionali. Le cellule dendritiche sono le APC maggiormente efficienti nell'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ vergini, grazie agli elevati livelli di espressione di complessi MHC II e molecole costimolatorie necessarie per il secondo segnale. Vi sono inoltre varie cellule mesenchimali ed epiteliali in grado di esprimere molecole di classe II costitutivamente o solo mediante stimolazione da parte di interferone-γ, con un ruolo diverso rispetto alle precedenti. Esse sono chiamate APC "non professionali". Un esempio è dato dalle cellule epiteliali timiche, che esprimono costitutivamente MHC di classe II, ma la cui funzione è legata alla maturazione dei timociti, non alla presentazione di antigeni (1). Le cellule endoteliali vascolari umane esprimono costitutivamente molecole di classe II *in vivo*, mentre in quelle di topo e di ratto le MHC II non sono costitutive ma inducibili (29). L'espressione sulle cellule endoteliali dei costimolatori CD80 e CD86, indispensabili per l'attivazione dei linfociti T, è stata riportata da alcuni studi (30–34), ma non da altri (35–37). La capacità di queste cellule di attivare linfociti T $CD4^+$ vergini è pertanto incerta (29). L'espressione costitutiva delle molecole MHC di classe II sulle cellule epiteliali bronchiali e alveolari dell'uomo, con particolare riferimento agli pneumociti di tipo II e all'epitelio ciliato, era stata inizialmente riscontrata (38–40). Ulteriori esami istopatologici non propendono tuttavia verso questa conclusione (41–44). Questi ultimi, infatti, pur rilevando la presenza di molecole MHC II sulle cellule epiteliali respiratorie nel corso di alcune patologie, come l'alveolite fibrosante e le infezioni da rhinovirus, hanno evidenziato l'assenza di un'espressione costitutiva di MHC II sull'epitelio respiratorio. Uno di questi studi ha dimostrato che CD80 è espresso costitutivamente sia sull'epitelio bronchiale che su quello polmonare, mentre solo l'epitelio polmonare manifesta CD86 (43). Un incremento dell'espressione di CD80 e CD86 sulle cellule epiteliali respiratorie è stato osservato in determinate condizioni infiammatorie, tra cui infezioni da rhinovirus e fibrosi polmonare idiopatica (43,44). A livello dell'apparato digerente, le molecole MHC di classe II sono espresse costitutivamente sulle cellule epiteliali della mucosa dell'intestino tenue (38,45–50), ma non a livello delle cellule della mucosa del colon (38,46,51–53). Nell'uomo, in condizioni fisiologiche, le MHC II sono più densamente rappresentate all'apice dei villi intestinali, mentre sono assenti in corrispondenza delle cripte di Lieberkuhn (53). L'interferone-γ agisce da induttore per le MHC II nelle mucose dell'intestino tenue e del colon dell'uomo (53). Nell'ambito di processi infiammatori, quali la sindrome

dell'intestino irritabile, la malattia celiaca e talune infezioni batteriche, l'espressione delle MHC II può essere incrementata sulla mucosa dell'intestino tenue e indotta sulla mucosa del colon (38,45–47,51–53). Uno studio immunoistochimico ha analizzato gli epiteli del tratto digerente del ratto, rilevandovi una presenza costitutiva di molecole MHC II sui dotti salivari e sulla mucosa dell'intestino tenue (54). In quest'ultima sede, le MHC II si dispongono in maniera largamente sovrapponibile a quella osservata nell'uomo, essendo maggiormente concentrate all'apice dei villi ed assenti nelle cripte di Lieberkuhn. Sempre nel ratto, l'IFN-γ induce l'espressione delle MHC II sulla mucosa del colon, sui dotti pancreatici e biliari e sulle cellule parietali dello stomaco (54). Le molecole costimolatorie CD80 e CD86 non sono costitutivamente espresse sulle cellule epiteliali dell'apparato digerente (50,55,56). Quanto alla possibile espressione di tali costimolatori nella sindrome dell'intestino irritabile, gli studi hanno prodotto risultati discordanti (56,57). Nonostante ciò, occorre anticipare che i linfociti T $CD4^+$ presenti nelle mucose sono prevalentemente cellule della memoria, per la cui attivazione non sono strettamente necessari segnali costimolatori, al contrario dei linfociti T $CD4^+$ vergini (58,59).

Processazione dell'antigene

Le vie di processazione dell'antigene all'interno delle APC implicano la trasformazione intracellulare di antigeni proteici derivanti da fagocitosi o presenti nel citosol a seguito dell'invasione della cellula in peptidi, e la successiva inserzione degli stessi nella tasca delle molecole MHC (1). Gli organuli e gli enzimi che prendono parte alla degradazione di tali proteine rientrano in un ruolo biologico di più ampio respiro, essendo coinvolti in funzioni che vanno ben al di là dell'elaborazione degli antigeni. Per il caricamento dei peptidi nelle molecole MHC occorre ridurre le proteine native in frammenti dalle caratteristiche fisico-chimiche adatte a farli alloggiare nella tasca delle molecole di classe I o II, a seconda del caso. I compartimenti cellulari contenenti i peptidi ottenuti devono convergere in quelli che ospitano le molecole MHC preformate; è infatti necessario che l'assemblaggio MHC-peptide avvenga prima dell'esposizione delle proteine a livello di membrana, in quanto la presenza del peptide è fondamentale per la corretta collocazione e la permanenza stabile del complesso. I processi che presiedono alla generazione dei peptidi e al loro caricamento su molecole di classe I sono però ben distinti e separati da quelli che operano le stesse funzioni per le MHC II. Tale segregazione parte dall'origine dei peptidi, citosolica per le MHC I, e endosomiale-lisosomiale per le molecole di classe II (1).

Biologia cellulare della presentazione di antigeni in complessi MHC di classe II

Dopo il legame ad un recettore e la conseguente fagocitosi, oppure in seguito a pinocitosi, l'antigene proteico si trova confinato negli endosomi, vescicole dal pH interno acido e contenenti enzimi (1). Gli endosomi possono fondersi con i lisosomi generando fagolisosomi. In questo ambiente, caratterizzato dalla presenza di proteasi che al pH acido di queste vescicole lavorano in modo ottimale, gli antigeni proteici vengono degradati proteoliticamente. Molti dei peptidi che ne scaturiscono mostrano le caratteristiche adatte ad occupare le tasche delle molecole MHC di classe II. Nonostante la maggior parte delle proteine presentate mediante MHC II sia di derivazione extracellulare, anche proteine citoplasmatiche possono

contribuire a comporre questi complessi. Ciò è possibile grazie ai processi di autofagia: segmenti di reticolo endoplasmatico inglobano materiale cellulare formando un autofagosoma. Tale vescicola si riversa nei lisosomi, i quali possono poi fondersi con endosomi contenenti MHC II, convogliandovi i frammenti di proteine autologhe. Anche proteine di membrana possono venire esibite da molecole MHC di classe II. Questo accade poiché le MHC vengono trasportate alla membrana dell'apparato di Golgi, al pari di tutte le altre proteine di membrana, con la possibilità di una complessazione tra le MHC e altre proteine in questo distretto. Inoltre, le proteine di membrana vengono riciclate per endocitosi e trasporto ai lisosomi, i quali possono poi trasferire i frammenti di degradazione ad endosomi, con lo stesso fenomeno visto nell'autofagia. Tra le proteine citosoliche e di membrana esibite dalle MHC II potrebbero figurare proteine virali che in queste sedi si stabiliscono; questo potrebbe spiegare in parte l'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ in risposta ad antigeni virali. Le catene α e β dell'MHC II si assemblano a livello del reticolo endoplasmatico. Le operazioni di ripiegamento ed assemblaggio sono assistite da chaperonine, quali la calnexina. Nel reticolo endoplasmatico, le due catene sono complessate ad una catena non polimorfa, la catena invariante (Ii), che ne favorisce lo sviluppo. Essa occupa la tasca della molecola, impedendo che peptidi presenti nel reticolo si leghino alle MHC II in fase di sviluppo, ma solo alle MHC di classe I, prive della catena. Dal reticolo endoplasmatico si dipartono vescicole che trasportano le MHC II verso i compartimenti contenenti i peptidi processati, con i quali si fondono. Sono state identificate vescicole contenenti elevate quantità di proteine MHC di classe II. Nei macrofagi e nei linfociti B umani esse sono note come MIIC (*MHC class II Compartments*), e contengono enzimi proteolitici, molecole MHC II associate a Ii, i peptidi, e la molecola HLA-DM. Nei MIIC la catena Ii viene degradata dalle proteasi lasciando adeso alla tasca delle MHC II un frammento di 24 amminoacidi, chiamato CLIP. La molecola HLA-DM, non polimorfa, rimuove il peptide CLIP, permettendo ai peptidi derivanti dagli antigeni di legarsi alla tasca. L'interazione con il peptide ha un effetto stabilizzante per il complesso, a tal punto che una molecola che non lo contiene non gode della stabilità necessaria a poter essere effettivamente espressa. La APC presenta contemporaneamente moltissime molecole MHC II a segnalare tutte le proteine endocitate. Ne consegue che ognuno dei complessi MHC II portanti lo stesso peptide sia rappresentato da un numero esiguo di copie espresse sulla stessa cellula. Un ulteriore problema è dato dalla peculiarità del fenomeno di endocitosi: la maggior parte del materiale che la cellula ingloba è costituito da proteine autologhe. Come risultato, anche le molecole MHC II riflettono tale proporzione, non essendovi un meccanismo intracellulare che discrimini il *self* dal *non-self*. Perciò, la cellula esibisce in larga parte complessi MHC relativi ad antigeni autologhi. Le proteine che espongono peptidi *non-self* rappresentano quindi una minoranza. Tuttavia, viene in soccorso la straordinaria sensibilità del recettore dei linfociti T per il suo specifico antigene, cosicché per l'attivazione del linfocita T antigene-specifico è sufficiente un piccolo numero di complessi MHC II-peptide (1).

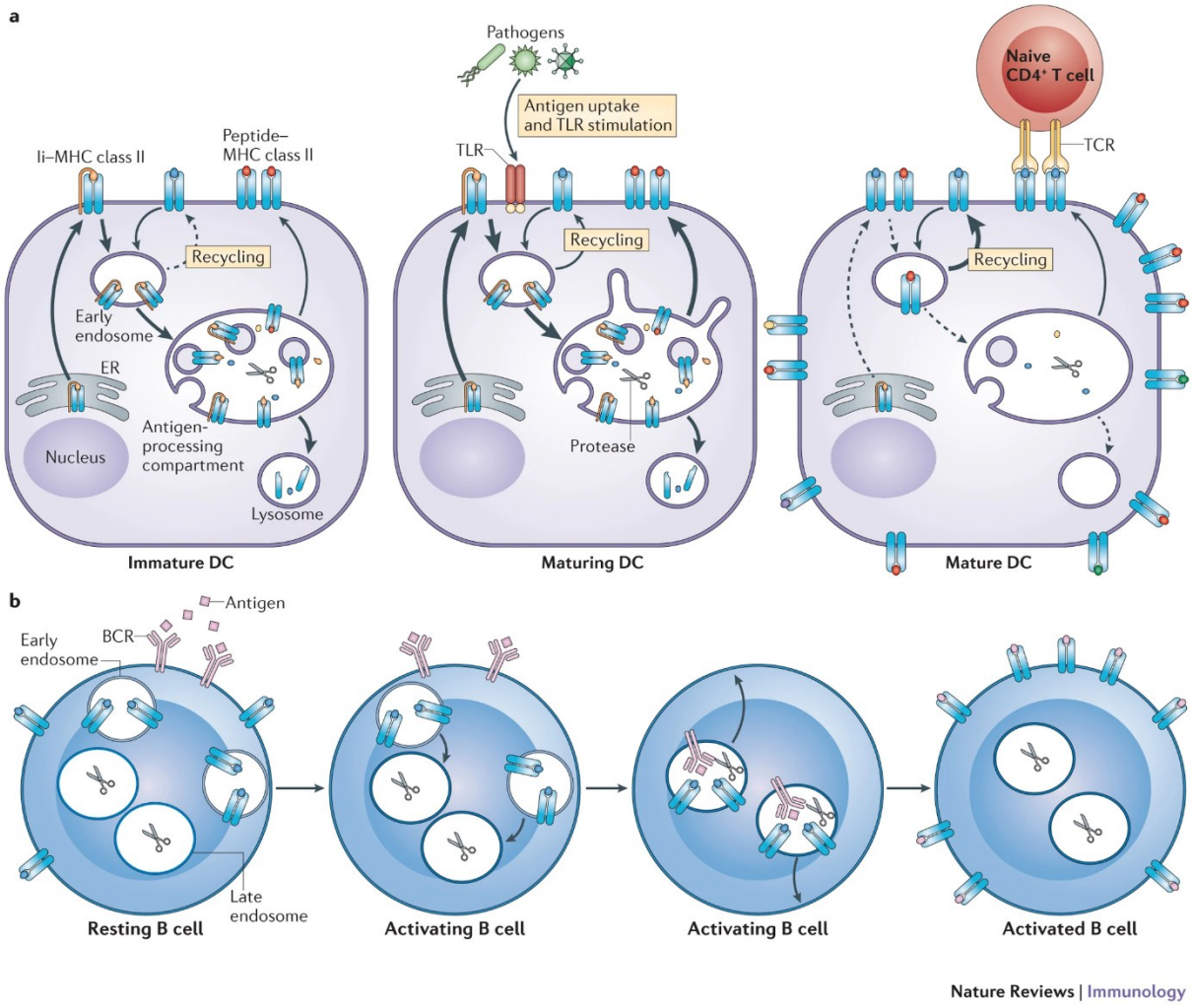

Figura 9. Processi di presentazione degli antigeni tramite molecole MHC II (60)**. a**) Nelle cellule dendritiche immature, le molecole MHC II risiedono principalmente negli endosomi. Le MHC II esposte sulla loro membrana presentano antigeni autologhi. Contestualmente alla captazione dell'antigene, la stimolazione dei TLRs incrementa la sintesi e la presentazione delle MHC II. **b**) I linfociti B che internalizzano l'antigene tramite il BCR processano l'antigene e lo espongono mediante MHC II.

Biologia cellulare della presentazione di antigeni in complessi MHC di classe I

I peptidi presentati da molecole MHC di classe I derivano prevalentemente da proteine presenti nel citosol (1). Di questi peptidi, una nutrita schiera deriva da proteine autologhe, ma vengono esposti tramite le MHC I anche prodotti virali e, in cellule tumorali, proteine risultanti dall'espressione di oncogeni o di geni mutati. Talvolta, però, le molecole di classe I possono veicolare peptidi derivanti da antigeni extracellulari. Può infatti verificarsi una traslocazione di materiale dagli endosomi al citosol. Una volta nel citoplasma, tali antigeni intraprendono il processo che li trasforma in peptidi destinati a combinarsi alle MHC di classe I. Le proteine citosoliche vengono degradate dal proteasoma, un grande complesso enzimatico multimerico presente nel citoplasma di gran parte delle cellule. Nella cellula, le proteine destinate alla degradazione vengono marcate attraverso il legame covalente con un polipeptide, l'ubiquitina. Il proteasoma scinde proteoliticamente tutte le proteine ubiquitinate in piccoli peptidi. Esistono varie configurazioni di proteasoma. Una di queste è costituita da una struttura cilindrica di 700

kDa, formata da due anelli interni e due esterni, tutti tra loro coassiali, ciascuno comprendente 7 subunità. A questa forma di base si possono associare altre subunità a comporre un'altra tipologia di proteasoma, di 1500 kDa, ed è quest'ultima ad avere rilevanza nella funzione di presentazione dell'antigene (1). L'interferone-γ stimola un aumento della trascrizione e della sintesi di alcune subunità catalitiche, di cui LMP-2 e LMP-7, codificate da geni della classe MHC III (1), e di MECL-1 (61,62). Queste proteine si sostituiscono ad altre subunità del proteasoma, modificandone la specificità di substrato e le caratteristiche dei peptidi generati (1). Tali peptidi hanno una lunghezza di 6-30 amminoacidi, con residui basici o idrofobici all'estremità C-terminale. Questi aspetti rendono il peptide adatto ad inserirsi nella tasca delle molecole MHC di classe I. L'attività del proteasoma non è necessaria per processare tutti gli antigeni proteici. Per alcuni possono infatti esistere altri meccanismi di proteolisi, quali le proteasi del reticolo endoplasmatico. Un esempio è dato dalle sequenze segnale delle proteine di membrana e di secrezione, che vengono rimosse a livello del reticolo endoplasmatico prima del trasporto della proteina alla membrana. I frammenti generatisi, qualora dotati delle caratteristiche molecolari opportune, si possono legare alle molecole MHC I, che proprio nel reticolo risiedono. I peptidi ottenuti dal proteasoma vengono trasferiti, mediante un meccanismo attivo ATP-dipendente, dal citoplasma al lume del reticolo, così da poter incontrare le MHC di classe I. Il trasporto è attuato dall'eterodimero TAP, le cui subunità sono ciascuna codificate da TAP1 e TAP2, geni MHC diclasse III. L'interferone-γ mostra attività potenziante sulla trascrizione e sulla sintesi delle subunità di TAP. TAP manifesta una spiccata affinità per peptidi dalle caratteristiche fisico-chimiche adeguate per l'inserimento in MHC di classe I. Sul lato interno della membrana del reticolo endoplasmatico TAP è legato non covalentemente a molecole MHC I neosintetizzate mediante una proteina, chiamata tapasina. Il posizionamento delle MHC I rispetto al trasportatore dei peptidi è dunque ideale a favorire l'interazione MHC-peptide. La sintesi e l'assemblaggio delle molecole MHC di classe I avvengono nel reticolo endoplasmatico, e il ripiegamento delle due catene dei dimeri è coadiuvato da chaperonine, di cui calnexina e calreticulina. Quando il peptide, introdotto nel reticolo endoplasmatico da TAP, si lega al dimero MHC I, la tapasina si stacca dal complesso trimerico così ottenuto. I dimeri di catena α e β2-microglobulina non legati al peptide sono instabili, al punto da non poter essere trasportati alla membrana. Nel reticolo endoplasmatico delle APC professionali, le molecole MHC I e II coesistono. Tuttavia, i peptidi di origine citosolica si legano selettivamente alle MHC I, e non alle MHC II. Questo accade sia perché la tapaina mantiene le MHC I a stretto contatto con TAP, laddove i peptidi fanno ingresso nel reticolo, sia perché la catena invariante (Ii) impedisce l'accesso alla tasca delle MHC II in tale distretto. Avvenuto il caricamento della molecola MHC di classe I con il peptide, il complesso può essere espresso sulla membrana (1).

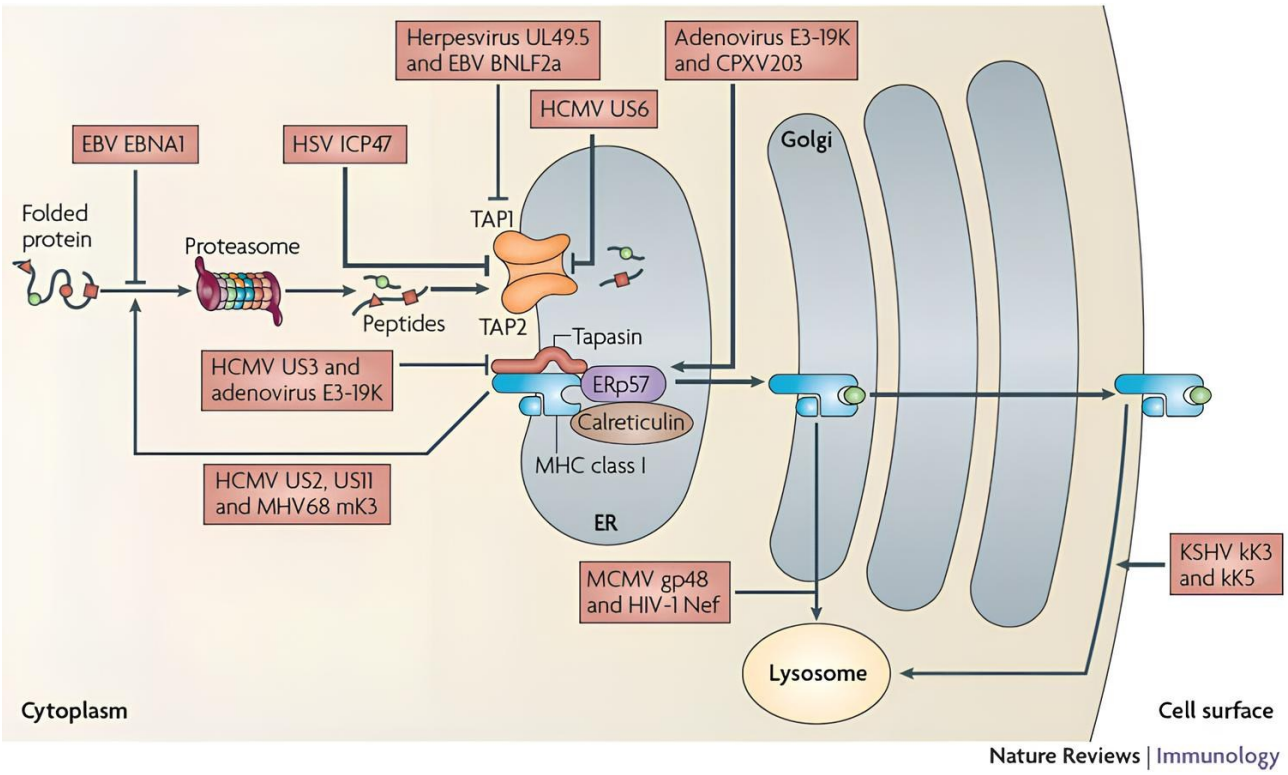

Figura 10. Presentazione cellulare dell'antigene tramite MHC I (63)**.** Si notino il ruolo del proteasoma e del dimero TAP nella processazione e la presentazione degli antigeni attraverso molecole MHC I. La figura illustra inoltre i meccanismi mediante i quali certe proteine prodotte da alcuni virus ostacolano questo processo.

Ruolo delle proteine MHC nell'immunogenicità

Le molecole MHC determinano l'immunogenicità degli antigeni peptidici (1). Per ogni antigene proteico, un individuo possiede in genere pochi cloni linfocitari T, ciascuno in grado di riconoscere specificamente un diverso determinante lineare della proteina. Tali sequenze sono note come epitopi immunodominanti. La proteolisi produce un grande numero di peptidi antigenici, ma solo un'esigua quantità di questi possiede un'adeguata affinità per le proteine MHC. Tale proprietà è dunque vincolante per determinare l'immunogenicità di un antigene. Lo studio degli epitopi immunodominanti ha grande importanza a livello biotecnologico, in particolare nella progettazione di vaccini. Le proteine dei microrganismi possono infatti essere studiate in base alla presenza di epitopi immunodominanti che mostrino un'elevata affinità per le molecole MHC. Le particolari forme alleliche delle molecole MHC II presenti in un soggetto influenzano le sue risposte agli antigeni. Il polimorfismo degli amminoacidi della tasca determina differenze nella capacità di legare i peptidi tra le varie forme alleliche (1).

RECETTORI E MOLECOLE DEI LINFOCITI T

La risposta dei linfociti T agli antigeni peptidici ha inizio con l'adesione stabile del linfocita ad una APC (1). Questo avviene grazie al legame tra una molecola MHC sulla superficie della APC e il recettore dei linfociti T (TCR) specifico per il peptide che la MHC racchiude. Il riconoscimento specifico da parte del TCR si estende su due fronti. Si ha infatti un'interazione specifica sia con residui polimorfi di una molecola MHC autologa, in ragione della restrizione per MHC del TCR, sia con il peptide antigenico. I recettori delle cellule T riconoscono solo determinanti lineari, legati alla sequenza amminoacidica del peptide antigenico, a differenza degli anticorpi, che legano anche determinanti conformazionali. Il TCR è un recettore clonalmente distribuito: ogni clone linfocitario T si distingue per la specificità del suo TCR, diverso per ogni clone. La trasduzione del segnale all'interno della cellula T è mediata dalle proteine CD3 e ζ, che si associano con il TCR. Al riconoscimento prendono parte anche altre proteine di membrana, che però non entrano in diretto contatto con il peptide antigenico. Esse sono note come molecole accessorie. Alcune di queste generano un secondo segnale che si addiziona a quello del complesso TCR, al fine di innescare la piena attivazione del linfocita T. Altre molecole accessorie permettono al linfocita di stabilizzare la propria interazione con la APC, agendo come molecole di adesione e prolungando il tempo di contatto; altre ancora permettono al linfocita di migrare verso i siti di risposta all'antigene. Inoltre, linfociti T attivati secernono ed esprimono a livello di membrana proteine in grado di regolare l'attività di altre cellule (1).

Aspetti biochimici del recettore dei linfociti T αβ

Nei linfociti T helper e T citotossici il recettore TCR è un eterodimero costituito da una catena α e una catena β legate covalentemente tra loro da un ponte disolfuro (1). Ciascuna delle due catene è formata da un dominio Ig N-terminale variabile (V), seguito da un dominio Ig costante (C), un dominio transmembrana e una porzione intracitoplasmatica di 5-12 amminoacidi C-terminale. Analogamente alle immunoglobuline, nelle regioni V delle catene si situano alcuni brevi segmenti ipervariabili CDR (*Complementarity Determining Regions*). La catena α possiede 3 CDR, mentre le catena β ne possiede 4. In entrambe le catene, il CDR3 è la regione con la più ampia variabilità. I segmenti da CDR1 a CDR3 della catena α si allineano ai corrispondenti nella catena β, formando il sito di riconoscimento del complesso MHC-peptide. La quarta regione ipervariabile della catena β, CDR4, non è coinvolta nel riconoscimento di molecole MHC o dei peptidi che esse caricano. Le regioni C di entrambe le catene si continuano con una regione cerniera, comprendente il ponte disolfuro intercatena, la quale precede il dominio transmembrana, il quale comprende amminoacidi carichi positivamente. Questi residui interagiscono con altri di carica negativa delle proteine CD3 e ζ. Il recettore TCR manifesta una struttura analoga al frammento Fab degli anticorpi, ma sussistono sostanziali differenze con le Ig. Il TCR, infatti, non ha un ruolo effettore nell'immunità, non presenta fenomeni di scambio isotipico, e durante la differenziazione dei linfociti T esso non va incontro a maturazione dell'affinità (1).

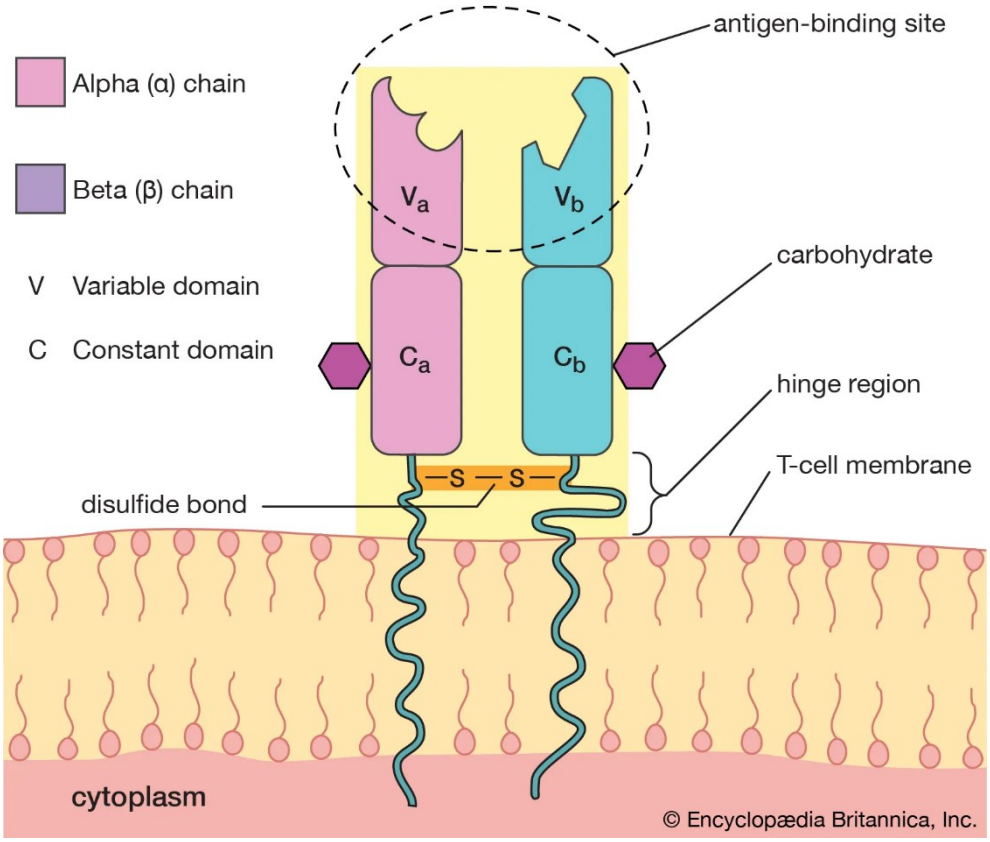

Figura 11. Struttura del TCR αβ (64)**.** Si noti il sito di legame per l'antigene.

Aspetti biochimici del legame tra TCR αβ e complesso MHC

Il sito di legame per l'antigene del TCR si presenta come una superficie planare formata dai CDR delle catene α e β, ed è responsabile sia del legame al peptide antigenico, sia della restrizione per MHC dei linfociti T (1). In alcuni TCR, le regioni ipervariabili CDR1, CDR2, CDR3 sono tutte impegnate nel legame con la molecola MHC; in altri, solo i tratti CDR1 e CDR2 interagiscono con la MHC, mentre il CDR3 è relegato esclusivamente al legame con il peptide antigenico. CDR3 mostra un ruolo predominante nell'interazione del recettore con il peptide, ossia la parte più variabile dei complessi MHC. Questo spiega la necessità da parte di CDR3 di possedere una variabilità maggiore rispetto alle altre regioni ipervariabili. L'affinità del TCR per il suo specifico complesso MHC è ben minore di quella di un anticorpo per il suo determinante. Il tasso di dissociazione è inoltre rapido: l'emivita del legame è di pochi secondi, rendendo necessarie altre molecole per prolungare l'interazione, altrimenti l'attivazione delle cellule T non sarebbe possibile (1).

Altre molecole del complesso TCR

Le proteine CD3 e ζ si associano non covalentemente al recettore TCR αβ, e hanno il solo ruolo di trasduttori del segnale all'interno della cellula T quando il recettore lega il complesso MHC (1). CD3 è un complesso di tre proteine, chiamate γ, δ ed ε. La catena ζ è presente nel complesso TCR umano come omodimero; nel topo è presente come eterodimero con la catena χ. CD3 e ζ sono proteine monomorfe: sono identiche per tutti gli individui della specie e non variano da un clone linfocitario all'altro. Le catene γ, δ ed ε sono tra loro omologhe. Sono dotate di un dominio Ig N-terminale extracellulare che si continua con un dominio transmembrana, contenente un residuo di aspartato, che interagisce con amminoacidi a carica positiva dei domini transmembrana delle catene α e β per stabilizzare il complesso. Le tre catene terminano con una coda intracitoplasmatica C-terminale di lunghezza variabile, ma contenente sempre un segmento ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Tale elemento è fondamentale per la trasduzione del segnale. La catena ζ presenta una porzione extracellulare N-terminale di 9 amminoacidi, un dominio transmembrana dotato di un residuo di aspartato, e una lunga regione intracellulare comprendente 3 motivi ITAM. Nel corso della maturazione dei linfociti T nel timo, le proteine di CD3 e le catene ζ vengono sintetizzate prima dell'espressione delle catene α e β del TCR. Quando anche queste ultime sono sintetizzate, avviene il ripiegamento e l'assemblaggio del complesso TCR a livello del reticolo endoplasmatico, con l'assistenza di chaperonine. L'esistenza del complesso TCR nella sua interezza è fondamentale per la sua espressione a livello di membrana: solo il complesso completato può esservi trasportato attraverso l'apparato di Golgi. Come conseguenza del riconoscimento dell'antigene, i domini ITAM delle catene CD3 e ζ vengono fosforilati. I residui di tirosina fosforilati diventano un sito di legame per chinasi con domini SH2, di cui ZAP-70 (*70 kDa Zeta-Associated Protein*), che si lega alle catene ζ, e Fyn, che si associa a CD3. Queste chinasi, così attivate, danno luogo ad una serie di eventi cellulari che alterano l'espressione genica dei linfociti T (1).

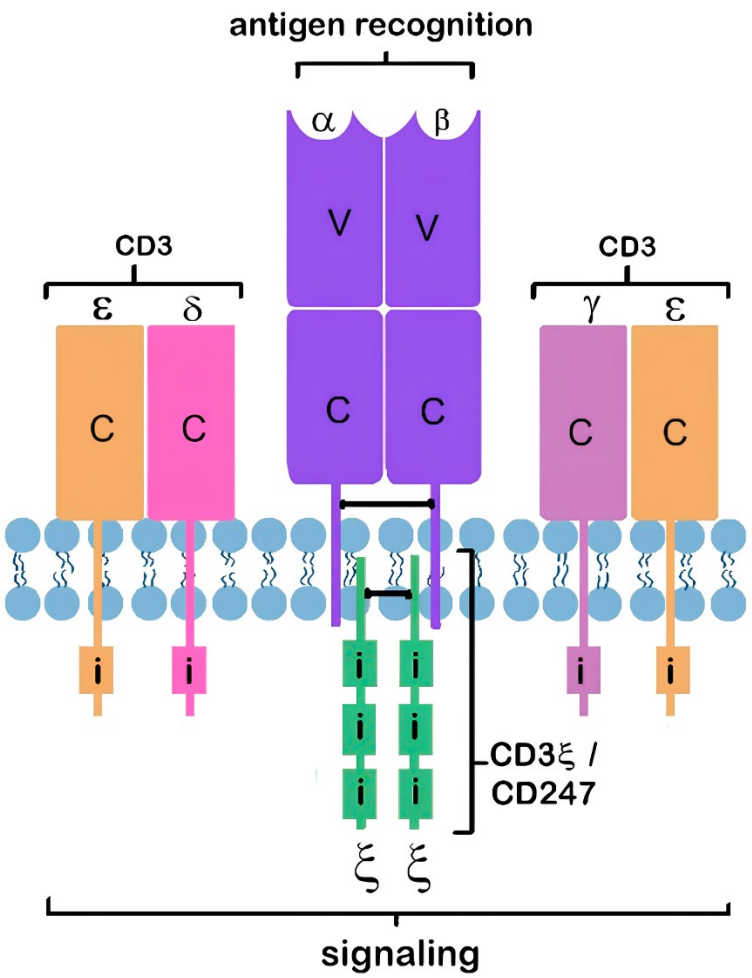

Figura 12. Schema strutturale del complesso TCR (65)**.** Si osservino i motivi ITAM, ciascuno contrassegnato da una lettera **i**, residenti nei domini intracitoplasmatici delle catene di CD3 e delle catene ζ. Riprodotto su licenza CC BY 4.0.

Recettore dei linfociti T γδ

Un altro tipo di recettore delle cellule T è il TCR γδ (1). Anch'esso, come il TCR αβ, si associa a CD3 e ζ. Esso è un eterodimero composto da due catene, chiamate γ e δ. La sua struttura rammenta pienamente il TCR αβ: le due catene si estendono in due domini Ig extracellulari, di cui uno variabile (V) e uno costante (C), una regione cerniera che collega le due catene tramite un ponte disolfuro, un dominio transmembrana dotato di residui a carica positiva, e un piccolo processo citoplasmatico. La trasduzione intracellulare del segnale si svolge in modo identico al TCR αβ. Il recettore γδ caratterizza una popolazione di linfociti T assai scarsamente rappresentata, appartenente ad uno stipite differenziativo diverso dai linfociti T ristretti per MHC. La maggior parte di queste cellule non esprime CD4 né CD8, pur svolgendo molte funzioni comuni anche ai linfociti T aventi il TCR αβ, tra cui la secrezione di citochine e l'attività citotossica. I linfociti T γδ rappresentano circa il 5% di tutti i linfociti, e la loro distribuzione tissutale è disomogenea. Essi popolano soprattutto gli epiteli, ove compongono una certa percentuale dei linfociti intraepiteliali. In diversi momenti dell'ontogenesi si formano varie sottopopolazioni di linfociti T γδ, ciascuna caratterizzata da una distinta regione V e in grado di colonizzare un distretto anatomico diverso. Nel topo, nel primo periodo di vita si

sviluppano linfociti T γδ a livello cutaneo senza alcuna diversificazione delle regioni V; in seguito, in altre aree anatomiche insorgono ulteriori sottopopolazioni, ciascuna esprimente un TCR con una regione V diversa. Nell'intestino tenue del topo e del pollo, i linfociti γδ rappresentano oltre il 50% dei linfociti intraepiteliali. Nell'uomo, conversamente, le cellule T γδ costituiscono solo il 10% dei linfociti intraepiteliali della mucosa intestinale. I ligandi dei linfociti T γδ sono in buona parte sconosciuti. Non possedendo restrizione per MHC, non riconoscono complessi MHC, ma alcuni linfociti T γδ si legano a lipoglicani batterici presentati dalla molecola non polimorfa CD1. Per via della loro scarsa diversificazione recettoriale e della loro distribuzione prevalentemente epiteliale, si ritiene che i linfociti T λδ abbiano un ruolo nella risposta ad antigeni che normalmente si incontrano a livello epiteliale, riconoscendo componenti antigenici comuni a molti microrganismi (1).

Molecole accessorie dei linfociti T

Oltre al complesso TCR, i linfociti T sono dotati di altre proteine integrali di membrana con un ruolo nella risposta all'antigene (1). Esse prendono il nome di molecole accessorie. Queste presentano alcune caratteristiche peculiari. Si tratta di proteine monomorfe, analogamente a CD3 e ζ. Ogni molecola accessoria interagisce con il proprio specifico ligando espresso sulla membrana di una APC, professionale o non, o di una cellula endoteliale vascolare, oppure presente nella matrice extracellulare. Spesso, quando si instaurano tali interazioni, le molecole accessorie trasducono segnali all'interno della cellula che integrano quelli contestualmente trasmessi dal TCR. Un altro importante ruolo di alcune molecole è legato all'aumento della forza di adesione tra il linfocita T e la APC, compensando al rapido tasso di dissociazione del solo legame tra MHC e TCR e favorendo dunque la piena attivazione dei linfociti T. Infine, l'interazione tra alcune molecole e i rispettivi ligandi a livello endoteliale e di matrice è essenziale per la migrazione e la permanenza dei linfociti T nei distretti anatomici sede di infiammazione e negli organi linfoidi secondari. Un fenomeno singolare riguardante queste ultime molecole è l'aumento della loro espressione e della loro affinità per il ligando a seguito dell'attivazione del linfocita T. Al contempo, anche l'espressione dei ligandi varia a livello degli endoteli dei diversi tessuti, e in particolare aumenta in distretti colpiti da infiammazione. Conseguentemente, queste modulazioni di espressione dei ligandi regolano il passaggio dei linfociti dal sangue ai focolai d'infiammazione e la loro ricircolazione dal sangue agli organi linfoidi (1).

Co-recettori CD4 e CD8

CD4 e CD8 sono co-recettori espressi dai linfociti T, i quali si legano a domini non polimorfi delle molecole MHC (1). Questi trasmettono un secondo segnale all'interno del linfocita che si addiziona a quello dato dal complesso TCR in seguito al riconoscimento antigenico, allo scopo di promuovere l'attivazione della cellula T. Ogni linfocita T maturo può esprimere il co-recettore CD4 oppure il CD8, ma mai entrambi i co-recettori assieme. È invece possibile l'assenza di entrambe le molecole, come visto per i linfociti T γδ. Quando il TCR riconosce il complesso MHC-peptide, il co-recettore CD4 o CD8 si lega alla molecola MHC, consolidando l'interazione tra linfocita T e APC. È proprio per la loro attività, strettamente coordinata con le funzioni del recettore TCR, che CD4 e CD8 guadagnano la definizione di co-recettori. Di tutti i linfociti T aventi il TCR αβ distribuiti nel sangue e negli organi linfoidi, circa il 65% esprime il

CD4, il restante 35% esprime il CD8. CD4 e CD8 sono glicoproteine transmembrana appartenenti alla famiglia delle Ig. CD4 è presente in forma monomerica su linfociti T maturi, timociti, fagociti mononucleati e talune cellule dendritiche. La sua porzione extracellulare, organizzata in 4 domini Ig, si continua con un dominio transmembrana, e una porzione intracitoplasmatica con residui basici. I due domini Ig N-terminali interagiscono con il dominio β2 delle molecole MHC di classe II. CD8 esiste come eterodimero di due catene CD8α e CD8β oppure come omodimero CD8α. In ogni caso, le due catene sono unite da un ponte disolfuro e ciascuna è costituita da un dominio Ig extracellulare, il quale si lega ad α3 delle molecole MHC I, un dominio transmembrana, e una coda citoplasmatica ricca in residui alcalini. Le porzioni intracellulari di CD4 e CD8 sono legate non covalentemente alla chinasi Lck. La partecipazione di CD4 e CD8 all'attivazione dei linfociti si articola in due meccanismi. In prima istanza, il legame tra co-recettore e MHC promuove l'adesione del linfocita alla APC. Inoltre, avendo TCR e co-recettori la stessa molecola quale ligando, l'interazione tra il TCR e il complesso MHC porta il co-recettore in diretta prossimità del complesso TCR, allorché Lck fosforila i motivi ITAM di CD3 e ζ. Questo avvia la cascata intracellulare di segnali per l'attivazione. La presenza di CD4 o di CD8 sulla superficie di un linfocita è l'elemento che ne determina la restrizione per MHC, data la specificità di legame di CD8 per le molecole MHC I e di CD4 per le MHC II. CD4 e CD8 non sono restrittivi per la funzionalità della cellula. Questo spiega l'esistenza delle popolazioni, seppur minoritarie, di linfociti $CD4^+$, quindi ristretti per MHC II, ma ad attività citotossica, e di linfociti T *helper* $CD8^+$ (1).

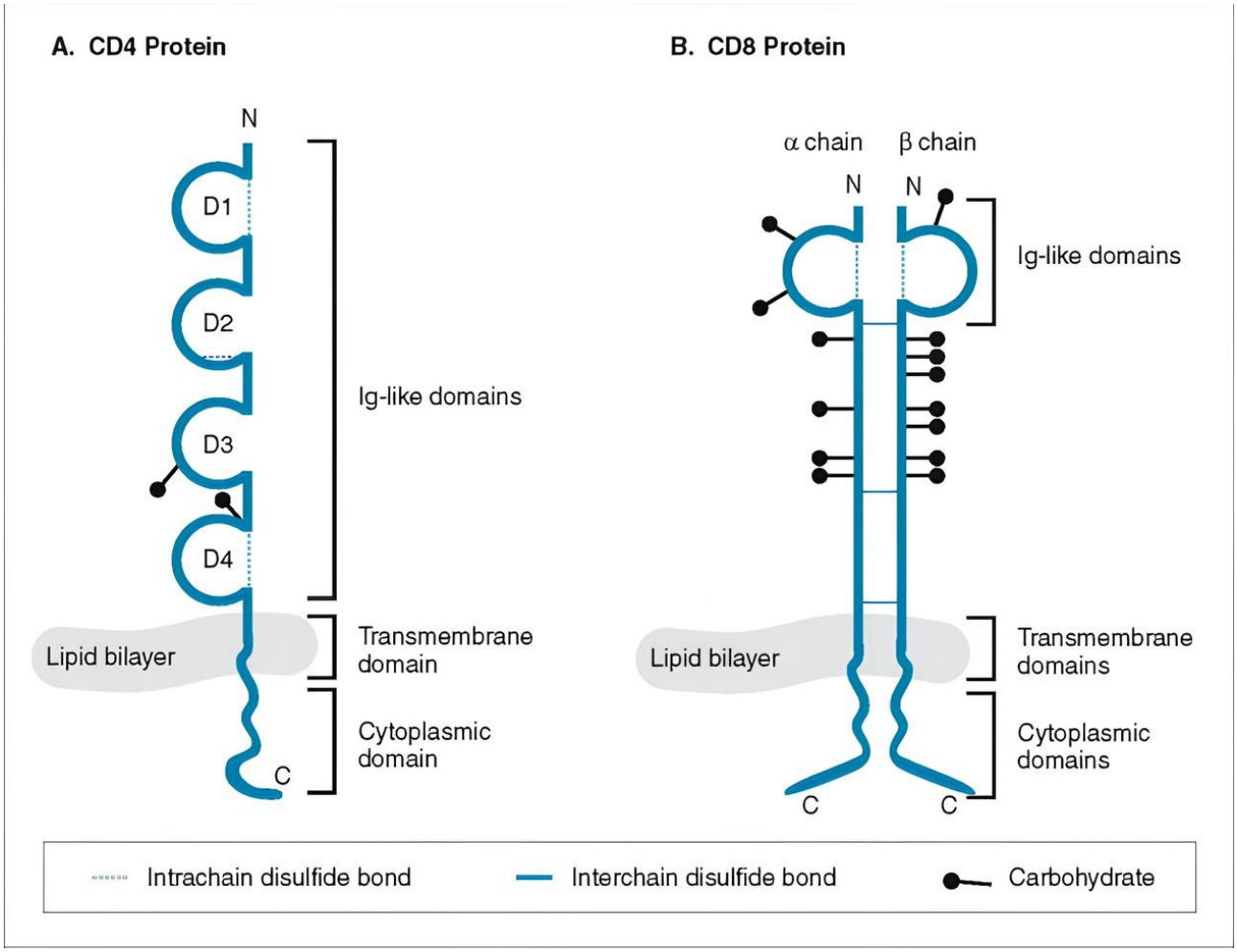

Figura 13. Schema strutturale dei co-recettori CD4 e CD8 (65)**.** Nell'immagine, CD8 è rappresentato nella sua forma eterodimerica CD8αβ. Si osservino i domini immunoglobulinici dei due co-recettori.

Costimolatori

I linfociti vergini necessitano di due segnali distinti per l'attivazione (1). Nei linfociti T, il primo è dato dall'interazione tra TCR e complesso MHC, il secondo è operato da molecole chiamate costimolatorie. CD80 e CD86 sono molecole costimolatorie espresse dalle APC professionali, i cui ligandi sono proteine di membrana dei linfociti T, tra cui CD28. CD28 è espresso costitutivamente dal 90% dei linfociti T $CD4^+$ e dal 50% dei linfociti T $CD8^+$ ed è un omodimero appartenente alla superfamiglia delle Ig. Esso trasduce all'interno del linfocita segnali antiapoptotici e di secrezione di citochine. Un altro ligando di CD80 e CD86 è CTLA-4, espresso dai linfociti T solo dopo l'attivazione. Pur interagendo con le stesse molecole a cui si lega CD28, CTLA-4 modula negativamente la risposta linfocitaria, antagonizzando gli effetti di CD28 (1).

CD45

CD45 è una famiglia che comprende 8 glicoproteine di membrana, derivanti dallo *splicing* alternativo dei trascritti del gene CD45 (1). Tali proteine si articolano in una porzione extracellulare di variabile lunghezza, un dominio transmembrana, e un'enorme coda intracitoplasmatica di ben 705 amminoacidi. Il dominio intracellulare svolge un'attività tirosin-fosfatasica intrinseca, e defosforila la chinasi Lck, attivandola. Le proteine CD45 sono espresse da una vasta gamma di leucociti, tra cui fagociti mononucleati, linfociti, timociti e polimorfonucleati. Le isoforme di CD45 rappresentate su un insieme ristretto di tipi cellulari prendono il nome di CD45R. CD45RA è espressa dai linfociti T vergini, mentre i linfociti T della memoria presentano CD45RO (1).

CD2

CD2 è una glicoproteina espressa su oltre il 90% dei linfociti T maturi, su buona parte dei timociti e sulle cellule NK (1). La sua struttura comprende 2 domini Ig extracellulari, un dominio transmembrana, e una lunga regione intracellulare. CD2 funge sia da molecola di adesione, sia da trasduttore del segnale. Nell'uomo, il principale ligando di CD2 è LFA-3 (*Leukocyte Function-associated Antigen-3*), anch'esso della superfamiglia delle Ig. LFA-3 esiste sia come proteina integrale di membrana, sia in forma ancorata alla membrana da un ponte fosfatidil-inositolico, ed è espresso da un ampio numero di cellule (1).

Molecole di adesione dei linfociti T

Tra le molecole accessorie, vi sono proteine in grado di mediare l'adesione dei linfociti T ad altre cellule e componenti tissutali. Queste rientrano principalmente nelle famiglie delle selectine e delle integrine (1).

Integrine

Le integrine sono proteine transmembrana espresse sui leucociti. Sono tutte costituite da un eterodimero, composto da una catena β1 o β2 combinata con una delle diverse catene α. Si

suddividono in due sottofamiglie, distinte in base al tipo di catena β (1). Le principali integrine dei linfociti T sono i VLA (Very Late Antigen), della sottofamiglia β1, e LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen-1*), della sottofamiglia β2. LFA-1 è espressa su oltre il 90% dei linfociti T maturi e dei timociti, sui linfociti B, sui polimorfonucleati e sui monociti, e tra i suoi ligandi figurano ICAM-1, una glicoproteina di membrana espressa da molte cellule, tra cui linfociti T e B, cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali, ICAM-2, espresso su cellule endoteliali, e ICAM-3, espresso su linfociti. VLA-4 interagisce con VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), espresso da cellule endoteliali attivate da citochine. Inoltre, VLA-4 e VLA-5 si legano alla fibronectina, mentre VLA-6 alla laminina. Le integrine espresse dai linfociti T ne mediano l'adesione alle cellule endoteliali attivate, alle APC e alla matrice extracellulare. L'avidità delle integrine per i loro ligandi aumenta a seguito del legame del TCR all'antigene o della stimolazione da parte di chemochine. L'aumento dell'avidità è caratterizzato da cambiamenti della porzione extracellulare dell'integrina, ed è accompagnato da riarrangiamenti del citoscheletro che concentrano le integrine nella regione di contatto con l'altra cellula. I livelli di espressione delle integrine incrementano dopo l'attivazione del linfocita, e le citochine pro-infiammatorie aumentano l'espressione dei loro ligandi a livello di APC e cellule endoteliali. Questi due fenomeni potenziano la capacità dei linfociti T attivati di aderire ad altre cellule nei focolai infiammatori, rendendone possibile la migrazione dal sangue e la permanenza in tali siti. Le integrine possono mediare un'iniziale adesione dei linfociti T alle APC anche in assenza del riconoscimento antigenico. In tal modo, le cellule T possono scandagliare la superficie delle APC cui aderiscono per rilevarne molecole MHC. Nel caso in cui il TCR riconoscesse il suo specifico complesso MHC, l'avidità dell'integrina per il suo ligando aumenterebbe, consolidando l'adesione già formata. Nei focolai infiammatori, il riconoscimento dell'antigene aumenta l'affinità delle integrine per la matrice extracellulare, permettendo la permanenza delle cellule T specifiche per l'antigene negli organi linfoidi e nei siti infiammatori, ove la loro presenza è richiesta per l'eliminazione dell'antigene. Le integrine sono fondamentali anche nell'adesione di granulociti e macrofagi alle cellule endoteliali (1).

Selectine

Le selectine sono proteine di membrana che si legano ai carboidrati. Sono espresse su leucociti, piastrine e cellule endoteliali (1). La selectina espressa dai leucociti è la L-selectina, molto rappresentata a livello dei linfociti T vergini, ma la cui espressione diminuisce dopo la loro attivazione. La L-selectina interagisce specificamente con residui carboidratici delle cellule endoteliali che tappezzano le venule ad endotelio alto (HEV), che caratterizzano tutti gli organi linfoidi secondari ad eccezione della milza. La L-selectina media dunque la migrazione dei linfociti T vergini nei distretti linfoidi periferici (1).

CD44

CD44 è una glicoproteina di membrana esistene in diverse isoforme derivanti da *splicing* alternativo (1). Si trova su numerosi tipi cellulari, tra cui linfociti T e B, timociti e macrofagi. Il suo livello di espressione è molto più elevato nei linfociti T attivati e della memoria rispetto ai vergini. CD44 lega l'acido ialuronico, e questa caratteristica è legata alla permanenza dei linfociti T attivati e della memoria a livello dei tessuti infiammati, analogamente a quanto osservato per le integrine (1).

Molecole effettrici dei linfociti T

Oltre ad essere dotati di molte molecole accessorie, i linfociti T esprimono molecole dedicate alle funzioni effettrici (1). I linfociti T $CD4^+$ esprimono il ligando di CD40 (CD40L), una proteina di membrana in grado di legarsi alla molecola CD40, presente su macrofagi, linfociti B, cellule dendritiche e cellule endoteliali. Il legame di CD40L a CD40 stimola nel macrofago l'attività microbicida e nel linfocita B la produzione di anticorpi. I linfociti T attivati esprimono il ligando del recettore Fas (FasL, CD95L), proteina che, legandosi al recettore Fas di un'altra cellula, determina l'apoptosi di quest'ultima. Questo è uno dei meccanismi impiegati dai linfociti T citotossici per uccidere le cellule bersaglio. Un'altra categoria di molecole effettrici prodotte dai linfociti T attivati sono le citochine, messaggeri proteici secreti che agiscono da fattori di crescita e differenziamento per altre cellule, tra cui i linfociti T stessi, che ne esprimono anche i recettori (1).

Aspetti anatomici e istologici della presentazione dell'antigene ai linfociti T $CD4^+$

Un antigene che penetra attraverso un epitelio viene captato ed internalizzato dalle cellule di Langerhans nel caso dell'epidermide, e dalle cellule dendritiche nelle mucose (1). Per maggiore semplicità, nella presente trattazione si considereranno le cellule dendritiche, ma le cellule di Langerhans attuano sostanzialmente gli stessi processi. La presenza dei prodotti microbici genera una contestuale risposta infiammatoria locale, con secrezione di citochine pro-infiammatorie da parte di cellule dell'immunità innata. Sotto l'influsso di tali sostanze, le cellule dendritiche retraggono i prolungamenti e assumono una forma rotondeggiante, perdendo adesività per le cellule circostanti. In tal modo, le cellule dendritiche possono infiltrare i tessuti fino a introdursi nei vasi linfatici ed essere trasportate ai linfonodi. Durante questo percorso, le cellule dendritiche subiscono una maturazione, con l'aumento graduale dell'espressione di MHC di classe II e di molecole costimolatorie, cosicché, all'arrivo nel linfonodo, la cellula è divenuta una APC pienamente funzionale. Il processo di migrazione è promosso da chemochine, citochine ad azione chemiotattica. I linfociti T vergini accedono al parenchima linfonodale attraversando l'endotelio delle venule ad endotelio alto (HEV). Le cellule dendritiche pervenute al linfonodo possono presentare l'antigene qualora venissero a contatto con il linfocita T specifico per il complesso MHC II. A tal punto, la cellula T vergine si attiva dando luogo alla risposta immunitaria specifica. La linfa veicola altresì antigeni in forma particolata, opsonizzata, e solubile. Filtrati nello stroma linfonodale, tali antigeni possono essere captati da cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B ivi residenti. I macrofagi fagocitano il materiale particolato ed opsonizzato, mentre i linfociti B legano antigeni solubili mediante il BCR, con successiva internalizzazione. Questi tre tipi cellulari processano gli antigeni e li presentano ai linfociti T $CD4^+$. In conseguenza di questi processi, gli antigeni presenti in periferia vengono concentrati a livello linfonodale. A livello degli epiteli mucosi, alla rete linfatica si aggiunge l'impatto del tessuto linfoide associato alle mucose (MALT), il quale ospita fenomeni di captazione dell'antigene da parte di APC e di presentazione dello stesso ai linfociti T. Le cellule T $CD4^+$ attivate migrano nei focolai infiammatori per svolgere le funzioni effettrici (1).

Aspetti anatomici e istologici della presentazione dell'antigene ai linfociti T CD8⁺

I meccanismi di presentazione dell'antigene ai linfociti T CD8⁺ differiscono sostanzialmente sul piano anatomico e funzionale rispetto a quelli descritti per i CD4⁺ (1). Perché un linfocita T CD8⁺ vergine possa attivarsi, è indispensabile che una APC presenti l'antigene specifico per tale linfocita in forma di complesso MHC di classe I, con l'aggiunta di segnali costimolatori provenienti dalla stessa APC o da linfociti T *helper*. Affinché ciò avvenga, la APC capta ed internalizza cellule infettate da virus e cellule affette da mutazioni di carattere neoplastico. I peptidi derivanti da tali cellule, nonostante l'origine extracellulare del materiale, vengono caricati in molecole MHC di classe I. Tale fenomeno è definito cross-presentazione. I linfociti T CD8⁺ attivati, la maggior parte dei quali esercita attività citotossica, possono così sopprimere le cellule esprimenti lo specifico complesso MHC I (1).

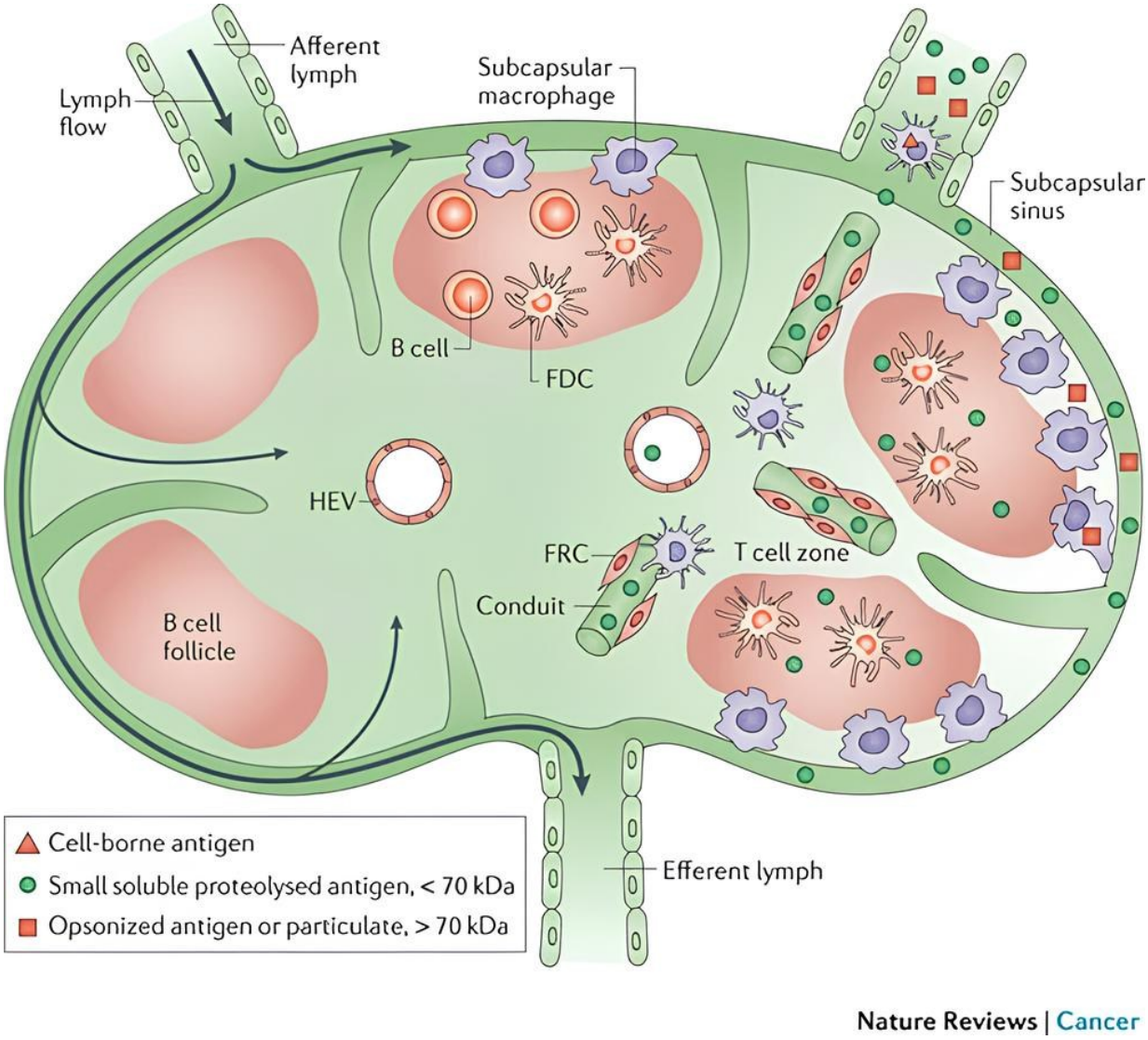

Figura 14. Presentazione dell'antigene ai linfociti (66)**.** Le cellule dendritiche e di Langerhans e gli antigeni solubili, particolati e opsonizzati raggiungono il linfonodo attraverso i linfatici afferenti e percolano nel seno sottocapsulare. Ivi giunti, le cellule dendritiche e di Langerhans e gli antigeni, accompagnati dal flusso della linfa, percorrono il seno sottocapsulare, i seni corticali e i seni midollari. Le ampie fenestrature e le discontinuità che caratterizzano l'endotelio di tali condotti forniscono alle APC e agli antigeni l'opportunità di accedere al parenchima linfonodale e di interagire con le cellule immunitarie ivi presenti.

CITOCHINE

Le citochine sono messaggeri proteici prodotti sia dal compartimento innato che da quello adattativo del sistema immunitario (1). Esse sono secrete in risposta ad un antigene, e sono in grado di regolare le funzioni esplicate dalle cellule di entrambi i rami dell'immunità. Le citochine promuovono l'espansione clonale e la differenziazione dei linfociti nella fase di attivazione delle risposte adattative, e mediano le funzioni di molte altre cellule nel corso della fase effettrice. Alcune citochine agiscono come fattori per lo sviluppo di cellule emopoietiche. Molte citochine sono prodotte da leucociti ed esercitano la propria principale funzione su di essi. È per questa ragione che svariate citochine hanno assunto il nome di interleuchine, indicate con la sigla IL, seguita da un numero. Tale nomenclatura è tuttavia alquanto imprecisa, in quanto tra le interleuchine sono classificate anche citochine non prodotte da leucociti, e il cui bersaglio primario non risiede in queste cellule. Ancor più vaga essa appare quando si nota che alcune citochine, pur essendo secrete esclusivamente da leucociti ed espletando solo su questi il loro ruolo biologico, non sono fatte ricadere tra le interleuchine. Le citochine si caratterizzano per alcuni aspetti degni di nota. Anzitutto, le citochine non vengono generalmente immagazzinate nelle cellule, e sono immediatamente secrete dopo la loro produzione. La loro sintesi richiede l'accensione di geni normalmente silenti, e gli RNA messaggeri che ne risultano sono spesso instabili. Per questi motivi la secrezione di citochine è un fenomeno di breve durata e autolimitante. In taluni casi, il processo di sintesi può dipendere da *splicing* alternativo del trascritto e da modificazioni post-trascrizionali. Numerose citochine presentano pleiotropismo, ossia la capacità di esercitare effetti su molteplici tipi cellulari. A questo, però, consegue una certa ridondanza dell'azione delle citochine: gli effetti di una citochina si sovrappongono spesso, almeno parzialmente, a quelli di altre. Una citochina può influire sulla sintesi di altre citochine attraverso l'accensione e lo spegnimento dei relativi geni codificanti. Le interazioni che si verificano tra le diverse citochine possono consistere in antagonismo, effetto additivo, o effetto sinergico, ossia un'azione superiore alla mera somma degli effetti dei mediatori. In merito alla localizzazione dell'attività, la maggioranza delle citochine mostra un'azione locale come messaggeri autocrini, ossia indirizzati alla stessa cellula secernente, o paracrini, ovvero destinati a cellule adiacenti. Talune citochine, alle alte quantità, possono accedere al circolo sistemico ed agire su distretti molto distanti da quello di produzione, fungendo quindi da ormoni endocrini. Ai fini dell'espletamento delle loro funzioni, le citochine si legano a specifici recettori di membrana espressi sulle cellule bersaglio. Tali recettori hanno un'affinità molto elevata per le citochine, superiore anche a quella dell'interazione antigene-anticorpo, cosicché le citochine riescono a trasmettere il segnale anche a concentrazioni molto basse. Nonostante le cellule bersaglio esprimano un quantitativo molto scarso di recettori specifici per ogni citochina, ciò non inficia sull'azione di tali messaggeri proteici. L'espressione dei recettori per le citochine è modulata da segnali esterni alla cellula. Questo fenomeno riveste una particolare importanza nell'immunità: l'aumentata espressione di recettori per le citochine nei linfociti B e T che hanno riconosciuto l'antigene garantisce la specificità dell'azione delle citochine a livello di tali cellule, in quanto le citochine, di per sé, non sono specifiche per l'antigene. L'espressione del recettore per una citochina può essere regolata da altre citochine o dalla stessa citochina. Quest'ultima può incrementare i livelli di espressione del recettore mediante un circuito di amplificazione oppure ridurli con un meccanismo a feedback negativo. La trasduzione del segnale che segue al legame della citochina al proprio recettore conduce generalmente a cambiamenti dell'espressione genica; questo principio vede tuttavia due importanti eccezioni. Esse sono le chemochine, le quali inducono la migrazione cellulare, e il TNF, che media

l'apoptosi della cellula bersaglio; in entrambi questi casi non si assiste a variazioni dell'espressione genica (1). Nella presente Sezione saranno trattate le principali citochine del sistema immunitario adattativo, mentre quelle prettamente legate all'immunità innata, vista la loro minore rilevanza alla luce di questa trattazione, saranno omesse.

Recettori per le citochine

I recettori per le citochine sono composti da una o più proteine transmembrana la cui porzione extracellulare costituisce il sito di legame per la citochina, mentre la trasduzione del segnale è affidata al dominio intracitoplasmatico (1). Ordinariamente, la cascata di trasduzione consegue all'aggregazione dei recettori prodotta dal legame con la citochina. In tal modo, i domini intracellulari dei recettori vengono portati tra loro in stretta prossimità. La più diffusa classificazione dei recettori per le citochine, basata sull'omologia tra le porzioni extracellulari dei recettori, consente di riconoscere 5 famiglie di recettori. I recettori di tipo I, altrimenti noti come recettori dell'emopoietina, presentano una o più copie di un dominio contenente due coppie di residui di cisteina e un caratteristico breve motivo conservato, dotato però di un amminoacido non costante. Tale struttura comune permette l'associazione del recettore con molecole ripiegate in quattro domini ad α-elica. Sono proprio i residui amminoacidici variabili a garantire la specificità di legame per una determinata citochina. I recettori di tipo II, simili ai precedenti, sono dotati di residui di cisteina conservati, ma mancano dell'ulteriore sequenza descritta per i recettori di tipo I. Taluni recettori per le citochine comprendono domini Ig nella loro porzione extracellulare, e sono quindi inquadrati nella superfamiglia delle Ig. Pur essendo accomunati da questo aspetto, i recettori che appartengono a questo gruppo differiscono tra loro per i meccanismi di trasduzione del segnale. I recettori per TNF possiedono domini conservati ricchi in cisteina nella regione extracellulare; essi possono attivare l'espressione genica, indurre l'apoptosi, o promuovere entrambe le risposte. I recettori per le chemochine sono recettori a 7 domini transmembrana accoppiati a proteine Gαi; questa struttura biochimica è propria anche di molti altri recettori coinvolti in un'ampia gamma di funzioni biologiche (1). Un'ulteriore categoria di recettori per le citochine è rappresentata dai recettori per TGF-β, i quali presentano attività serina-treonina chinasica e al contempo tirosina chinasica (67).

Chemochine

Le chemochine sono piccole proteine dal peso molecolare di 8-12 kD, con la funzione di regolare la migrazione dei leucociti e il loro reclutamento dal sangue ai tessuti (1). Nel corso delle risposte infiammatorie, le chemochine agiscono sui leucociti determinandone, in pochi secondi, profonde alterazioni morfologiche, con formazione di processi citoplasmatici lamellari. Mediante cicli di polarizzazione e depolarizzazione di filamenti citoscheletrici, le chemochine determinano lo spostamento dei leucociti verso la sorgente di tali proteine, seguendo il loro gradiente di concentrazione. Parallelamente, le chemochine inducono un aumento dell'affinità delle integrine leucocitarie per i rispettivi ligandi espressi sull'endotelio (1). Tra loro, le chemochine presentano omologia strutturale, e sono tutte caratterizzate da quattro residui di citochina conservati, i quali si appaiano a formare due ponti disolfuro (68). Sulla base dei due residui di cisteina N-terminali, le chemochine sono raggruppate in quattro sottofamiglie, chiamate rispettivamente CC, (X)C, CXC, e CX3C. Nelle chemochine CC i due

residui di cisteina N-terminali si trovano adiacenti, mentre nelle CXC essi sono separati da un amminoacido. La chemochina CX3CL1, altrimenti nota come fractalchina, è l'unico membro della famiglia CX3C e tra i suoi due residui N-terminali di cisteina si interpongono tre amminoacidi (68). Le chemochine sono secrete da leucociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali e fibroblasti (1). Dal punto di vista funzionale, si distinguono diverse categorie di chemochine (68). Le chemochine infiammatorie, la cui sintesi è promossa negli stati infiammatori, reclutano i leucociti nei focolai infiammatori. Tra queste, le chemochine CXC dotate di un motivo detto ELR subito a monte del primo residuo di cisteina stimolano l'angiogenesi. Le chemochine omeostatiche sono invece costitutivamente prodotte negli organi linfoidi, ove mediano la migrazione di vari tipi cellulari, tra cui i linfociti, dal sangue a questi distretti. Alcune chemochine ricoprono entrambi questi ruoli, e sono pertanto chiamate "*dual-function*". Queste categorie funzionali non devono però essere intese come mutualmente esclusive. Invero, alcune chemochine infiammatorie potrebbero avere un ruolo omeostatico, mentre certe chemochine omeostatiche potrebbero essere sovraespresse durante processi infiammatori (68). Le chemochine CC e CXC sono in grado di associarsi a proteoglicani eparan-solfati presenti sulla membrana delle cellule endoteliali; di fatto, la principale forma attiva di alcune chemochine è quella legata alla superficie cellulare (1). Lo scopo di tale fenomeno è quello di concentrare le chemochine a livello delle sedi endoteliali con le quali i leucociti interagiscono tramite le molecole di adesione, allo scopo di promuoverne in maniera più efficace il reclutamento (1). La relazione che sussiste tra le chemochine e i relativi recettori è alquanto promiscua: in molti casi, una stessa chemochina può associarsi a più di un recettore, e un singolo recettore per le chemochine riconosce spesso più di un ligando (68). Ad oggi, sono 18 i recettori ad attività chemotattica per le chemochine accoppiati a proteine Gαi identificati nell'uomo e nel topo. Tali recettori sono suddivisi in quattro sottofamiglie in base alla sottofamiglia del loro principale ligando (68). Oltre a questi, sono stati descritti anche recettori atipici per le chemochine (ACKRs, *Atypical ChemoKine Receptors*), i quali non esercitano una funzione chemotattica, ma sono associati al recupero, al sequestro e al trasporto delle chemochine attraverso le cellule endoteliali, di fatto regolando la biodisponibilità delle chemochine nei confronti dei leucociti migranti (69). Quelli al momento riconosciuti sono ACKR1, precedentemente noto come DARC, ACKR2, un tempo chiamato D2 o CCBP2, ACKR3, altrimenti noto come CXCR7, e ACKR4. Questi recettori sono organizzati in 7 domini transmembrana, al pari dei recettori tipici. A differenza di questi ultimi, tuttavia, essi comunemente non elicitano le vie di segnalazione tipicamente attivate dai recettori tipici, non associandosi a proteine Gαi né portando ad un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} per liberazione dai depositi cellulari. Gli ACKR mostrano un profilo di espressione divergente rispetto ai recettori tipici per le chemochine. Sono infatti prevalentemente espressi su cellule non dotate di motilità, nello specifico cellule endoteliali e stromali, mentre si riscontrano in minor misura sui leucociti. Malgrado ciò, sono note categorie di leucociti esprimenti ACKR. Le cellule endoteliali venose e linfatiche esprimono diversi ACKR; ACKR1 è molto rappresentato a livello degli eritrociti e delle cellule di Purkinje del cervelletto. Gli ACKR, ad eccezione di ACKR1, reclutano le β-arrestine, le quali mediano l'endocitosi del complesso recettore-ligando e possono inoltre attivare le vie di segnalazione delle MAPK e di AKT (69). Nel caso di ACKR4, uno studio del 2020 ha dimostrato che per l'internalizzazione recettoriale e il recupero delle chemochine da parte di tale recettore non è indispensabile l'intervento delle β-arrestine, pur potendo queste contribuirvi (70).

Interleuchina-2

L'interleuchina-2 (IL-2) è una glicoproteina di 14-17 kD ripiegata in una struttura globulare comprendente 4 domini ad α-elica (1). A lungo si discuterà in seguito il ruolo dell'IL-2 nell'espansione clonale dei linfociti T che segue al riconoscimento antigenico. L'IL-2 è prodotta da linfociti T $CD4^+$ e, in minori quantità, anche dai CD8+. La sua secrezione è transitoria, con un picco a 8-12 ore dall'attivazione del linfocita. Il recettore dell'IL-2 (IL-2R) è di tipo I, ed è composto da tre catene, chiamate α, β e γ, tra loro associate tramite interazioni non covalenti. IL-2Rα è espressa dai linfociti solo dopo l'attivazione ed ha bassa affinità per l'IL-2; peraltro, l'interazione di IL-2 con IL-2Rα non ha rilevanti effetti biologici. IL-2Rβ si trova in scarse quantità sui linfociti T quiescenti e sulle cellule NK, associata a IL-2Rγ, la quale fa parte anche di recettori per altre citochine, quali l'IL-4. L'attivazione del linfocita T causa un rapido aumento dell'espressione di IL-2Rα, e il trimero IL-2Rαβγ che ne risulta ha un'affinità 100 volte maggiore per l'IL-2 rispetto a IL-2Rβγ. In tal modo, l'IL-2, alle concentrazioni fisiologicamente raggiunte nel corso delle risposte adattative, agisce principalmente sui linfociti T attivati dall'antigene. In ultima analisi, l'espressione del recettore trimerico determina la specificità d'azione dell'IL-2. Un'attivazione di lunga durata dei linfociti T determina il rilascio di IL-2R nei fluidi biologici. IL-2R sierico rappresenta un marcatore clinico di severe patologie infiammatorie, come il rigetto acuto di allotrapianto. Il legame di IL-2 a IL-2R ha numerose conseguenze funzionali nel linfocita. Si ha un aumento dell'espressione di ciclina D2 e ciclina E, le quali azionano talune chinasi ciclina-dipendenti. Queste ultime attivano per fosforilazione alcune proteine che portano la cellula dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Tale effetto è favorito dall'IL-2 anche mediante la riduzione di p27, una proteina che inibisce le chinasi ciclina-dipendenti. Al contempo, l'IL-2 induce la proteina anti-apoptoica Bcl-2, promuovendo la sopravvivenza cellulare. Nonostante l'IL-2 si comporti principalmente da messaggero autocrino, può esercitare anche un'azione paracrina, determinando la proliferazione delle cellule adiacenti. L'IL-2 agisce inoltre come induttore per la sintesi di altre citochine, tra cui l'IL-4 e l'IFN-γ, nei linfociti T. Se da una parte l'IL-2 promuove la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T, dall'altra, quasi paradossalmente, li rende più suscettibili all'apoptosi mediata da Fas. Tale fenomeno diviene maggiormente evidente alle concentrazioni elevate di IL-2 che vengono raggiunte nelle fasi più avanzate della risposta adattativa. L'IL-2 induce anche la proliferazione delle cellule NK e il loro differenziamento in cellule killer attivate da linfochine (LAK, *Lymphokine-Activated Killer*). Esprimendo IL-2Rβγ anziché la forma trimerica del recettore, le cellule NK rispondono solo alle più alte concentrazioni di IL-2. Nelle cellule NK, IL-2Rβγ si associa alla catena α del recettore dell'IL-15, cosicché l'IL-15 rappresenta un potente fattore di crescita per queste cellule. L'IL-2 ha inoltre un'azione proliferativa sui linfociti B, a livello dei quali essa potenzia altresì la produzione di anticorpi (1).

Interleuchina-4

L'interleuchina-4 (IL-4) è dotata 4 domini ad α-elica ed è prevalentemente prodotta dai linfociti T helper della sottopopolazione Th2 (1). Sorgenti secondarie sono rappresentate dai mastociti e dai basofili. L'IL-4 media lo scambio isotipico verso le IgE nelle cellule B. Essa induce inoltre l'espansione clonale e la differenziazione dei linfociti T helper vergini in cellule della sottopopolazione Th2, fungendo da fattore di crescita autocrino. Si ricordi che le IgE e i linfociti Th2 agiscono di concerto nelle risposte contro elminti e artropodi. L'IL-4 secreta dalle

cellule Th2 antagonizza l'effetto che l'IFN-γ esercita sui macrofagi, smorzando quindi le risposte cellulo-mediate. Più in generale, l'IL-4 promuove le risposte dei mastociti, dei basofili e degli eosinofili, spegnendo invece quelle dei macrofagi. Si conoscono due distinti recettori per l'IL-4. Il recettore per l'IL-4 delle cellule linfoidi è di tipo 1 ed è costituito da una catena IL-4Rα, responsabile del legame alla citochina, abbinata alla catena γ comune di IL-2R, che invece trasduce il segnale. Una volta legata la citochina, tale recettore innesca le vie JAK/STAT e IRS-2 (*Insulin Response Substrate*). Nel primo caso, l'IL-4 attiva STAT6, proteina che media la differenziazione dei linfociti T in cellule Th2 e, nei linfociti B, lo scambio isotipico verso le IgE. La via di IRS-2 conduce invece alla proliferazione cellulare. Il recettore per l'IL-4 espresso su cellule non linfoidi è di tipo II ed è composto dalla stessa IL-4α combinata alla catena α1 del recettore per l'IL13 (IL-13Rα1) (1).

Interleuchina-5

L'interleuchina-5 (IL-5) è un omodimero le cui due subunità contengono 4 domini ad α-elica (1). Il suo recettore, di tipo I, comprende una catena dedicata al legame dell'IL-5 associata ad un'altra deputata alla trasduzione del segnale attraverso la via JAK/STAT. Quest'ultima, nota come "catena β comune", rientra anche nella composizione di altri recettori. Le fonti di IL-5 sono i linfociti Th2 e i mastociti attivati. L'IL-5 esplica le proprie principali attività a livello degli eosinofili: essa induce la proliferazione, la differenziazione e l'attivazione degli eosinofili. L'IL-4 e l'IL-5, entrambe secrete dalle cellule Th2, agiscono sinergicamente nelle risposte agli elminti poiché, come si analizzerà successivamente, le IgE e gli eosinofili rappresentano i pilastri della lotta contro questi parassiti. Altre azioni dell'IL-5 sono la stimolazione della proliferazione dei linfociti B e della produzione di IgA, anche queste funzioni sono svolte anche da altre citochine (1).

Interferone-γ

L'interferone-γ (IFN-γ), la cui struttura è omodimerica, è il principale attivatore dei macrofagi, e svolge pertanto un ruolo sia nell'immunità innata che nelle risposte cellulo-mediate (1). Conosciuto come IFN di tipo II, l'IFN-γ ha una minore attività antivirale rispetto agli IFN di tipo I, con un ruolo invece incentrato sull'elicitazione dei meccanismi effettori dell'immunità. I tipi cellulari che secernono IFN-γ sono le cellule Th1, le cellule NK e i linfociti T $CD8^+$. Nell'ambito dell'immunità innata, le cellule NK producono IFN-γ a seguito del riconoscimento non specifico di componenti microbiche oppure in risposta all'IL-12. Nel corso delle risposte specifiche, a secernere l'IFN-γ sono i linfociti T. In questo caso, il segnale che precipita la produzione di questa citochina è il riconoscimento antigenico, con l'ulteriore azione favorente dell'IL-12. Il recettore per l'IFN-γ è un complesso eterodimerico le cui due subunità sono tra loro strutturalmente omologhe. Una di esse è responsabile del legame alla citochina, l'altra della trasduzione del segnale. Il legame di IFN-γ al suo recettore attiva il fattore di trascrizione STAT1. Tra gli effetti di STAT1 figurano l'aumentata espressione delle molecole MHC, dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e di talune citochine. STAT1 attiva inoltre altri fattori di trascrizione che condizionano ulteriormente l'azione dell'IFN-γ. L'IFN-γ ha un ampio spettro di effetti biologici. Esso attiva i macrofagi potenziando le loro capacità microbicide; ciò avviene mediante incremento della produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno e di ossido nitrico nei lisosomi, ottenuto grazie all'induzione dei geni codificanti per i relativi enzimi e all'eventuale

efficientamento dell'assemblaggio dei complessi enzimatici. Tale fenomeno ha importanti risvolti nell'immunità cellulo-mediata. Altre importanti cellule bersaglio dell'IFN-γ sono le APC, a livello delle quali esso accresce l'espressione di molecole MHC di classe I e II, di molecole costimolatorie e di proteine coinvolte nella processazione e nella presentazione antigenica. Tra queste ultime si trovano TAP, le subunità LMP-2 e LMP-7 del proteasoma e le molecole HLA-DM. L'efficienza della presentazione dell'antigene ai linfociti T è quindi enormemente aumentata. Parallelamente, l'IFN-γ attiva anche l'endotelio di concerto con il TNF, favorendo quindi l'adesione endoteliale e la conseguente extravasazione dei linfociti T. A livello dei linfociti B, l'IFN-γ promuove lo scambio isotipico verso gli anticorpi IgG e inibisce gli scambi indotti dall'IL-4. Le IgG mediano la fagocitosi dei microrganismi a cui si associano legandosi ai recettori Fcγ dei fagociti e attivando il complemento. Tale azione è complementare alla contestuale attivazione dei macrofagi sopra descritta. L'IFN-γ attiva inoltre i neutrofili e favorisce l'attività citolitica delle cellule NK. L'INF-γ provoca la differenziazione di linfociti T helper $CD4^+$ in cellule Th1; tale effetto è però indiretto, in quanto è l'IL-12 secreta dai macrofagi in risposta all'IFN-γ a mediare questa trasformazione nei linfociti. In ultima analisi, l'IFN-γ promuove fenomeni infiammatori in cui predomina l'attività dei macrofagi, con la sostanziale inibizione delle risposte degli eosinofili (1).

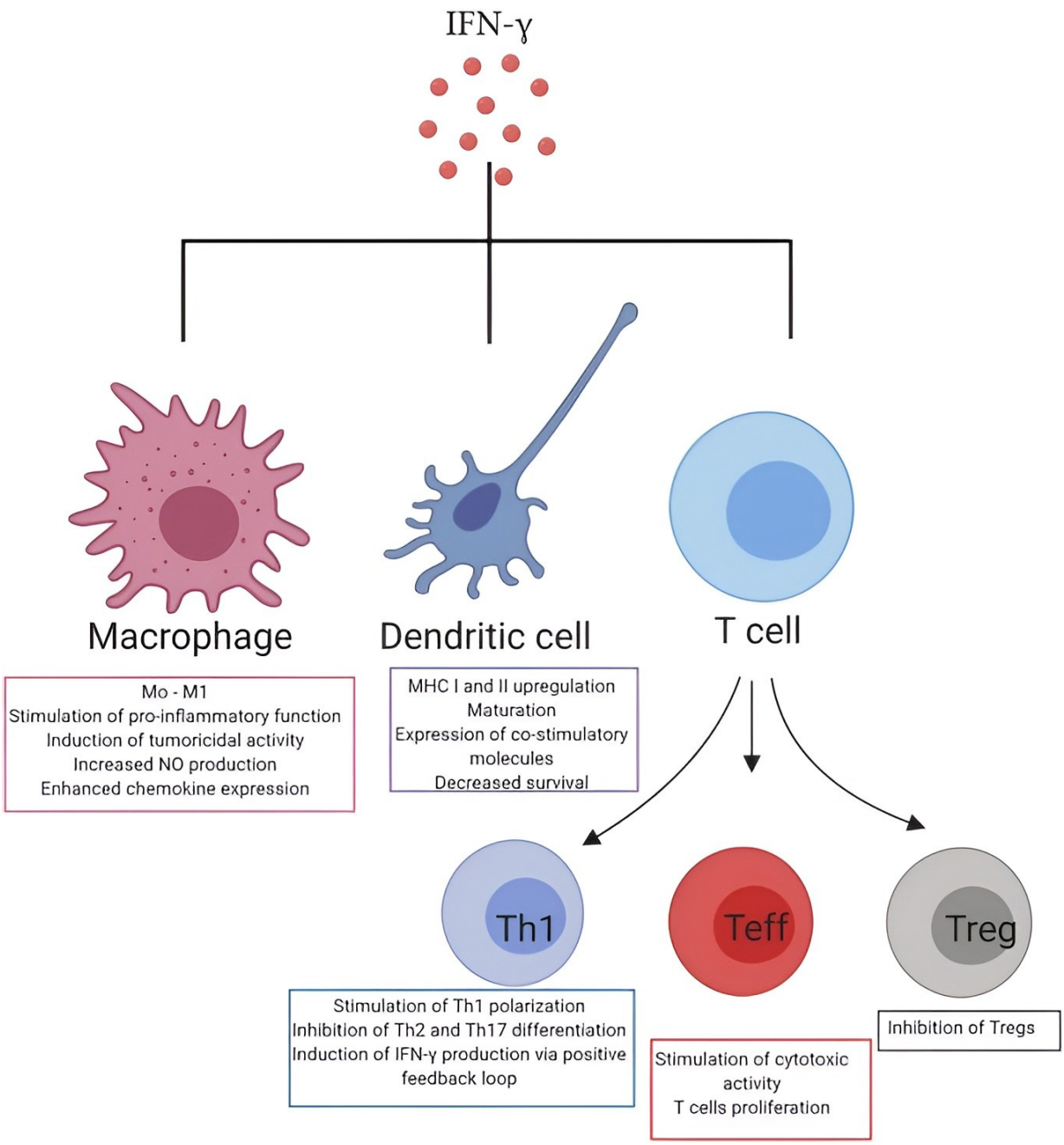

Figura 15. Sommario delle attività dell'IFN-γ sulle cellule del sistema immunitario (71)**.**

Fattore di crescita trasformante-β

Il fattore di crescita trasformante-β (TGF-β, *Transforming Growth Factor-β*) ha molteplici ruoli nell'organismo (1). Nel sistema immunitario, esso reprime la proliferazione dei linfociti e di altri leucociti. Il TGF-β esiste in tre isoforme, chiamate TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3 e codificate da tre distinti geni. TGF-β1 è la principale forma prodotta dalle cellule del sistema immunitario. Il TGF-β1, la cui struttura è omodimerica, è sintetizzato in forma di precursore. La sua forma attiva è ottenuta mediante taglio enzimatico. La maggior parte dei leucociti secernono TGF-β1, tra cui alcuni linfociti T attivati dall'antigene e monociti e macrofagi stimolati dall'LPS (1). Una particolare sottopopolazione di cellule T $CD4^+$, i linfociti T regolatori (Treg), svolge un ruolo immunosoppressivo, mantenendo la tolleranza periferica al *self* e prevenendo patologie

infiammatorie croniche (72). Al contempo, tuttavia, inibiscono anche le risposte ai parassiti, ai virus e alle cellule tumorali. Sono molteplici i meccanismi che i linfociti Treg mettono in atto per esercitare queste funzioni (72). Tra questi, vi è la produzione di citochine immunosoppressive, quali TFG-β1, l'IL-10 (72), e la più recentemente scoperta IL-35 (73). Il TGF-β sopprime le risposte immunitarie e infiammatorie, essenzialmente mediante l'antagonismo delle citochine pro-infiammatorie; esso reprime la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T e l'attivazione dei macrofagi, dei leucociti polimorfonucleati e dell'endotelio (1). Uno studio del 1989 ha rivelato che il TGF-β agisce come potente induttore dello scambio isotipico verso le IgA nei linfociti B murini (74). L'esperimento si è basato su colture di cellule B murine stimolate con LPS. Un ulteriore lavoro condotto su linfociti B umani confermò l'attività di promozione dello scambio isotipico verso le IgA da parte del TGF-β anche nell'uomo (75). Addizionalmente, il TGF-β promuove la sintesi di integrine, di proteine della matrice extracellulare tra cui il collagene, di enzimi di rimodellamento della matrice come le metalloproteasi (1). Il TGF-β inibisce la proliferazione dei precursori dei linfociti B nel midollo osseo. Tale fenomeno si verifica sia per inibizione diretta sia mediante soppressione della secrezione di IL-7 da parte delle cellule stromali (76,77).

Linfotossina

La linfotossina è una citochina della superfamiglia del fattore di necrosi tumorale (TNF) (78). La linfotossina-α (LTα) forma un omotrimero solubile che si lega con elevata affinità ai recettori 1 e 2 del TNF (TNFRSF1A, TNFRSF1B), pur esercitando un'attività inferiore rispetto al TNF. Essa fu originariamente identificata come un prodotto dei linfociti avente effetti citotossici su cellule tumorali *in vitro*. La linfotossina-β (LTβ) si assembla invece in eterotrimeri con unità di LTα a formare proteine di membrana il cui recettore specifico è LTβR (TNFRSF3). La forma di superficie della LT è espressa da linfociti B e T, cellule NK, cellule dendritiche e cellule linfoidi innate. LTβR si trova invece prevalentemente su cellule non linfoidi, tra cui cellule epiteliali, cellule stromali, cellule dendritiche e macrofagi. Il legame della citochina di membrana al recettore apre dunque un ponte di collegamento tra cellule linfoidi e non linfoidi. Il ruolo della LT nell'organogenesi del sistema linfoide è ben caratterizzato. Nei topi, l'inattivazione di geni che codificano LTα, LTβ, o LTβR conduce ad assenza di linfonodi e placche di Peyer e a gravi aberrazioni istologiche della milza, del timo e di altri organi linfoidi. A queste anormalità anatomiche conseguono deficit delle risposte immunitarie. Studi basati su questi modelli murini hanno evidenziato compromissioni delle risposte antivirali dei linfociti T citotossici, con rallentamento della clearance del virus in molti casi (78). Si menziona in particolare uno studio in cui si analizzavano gli esiti dell'infezione con il virus dell'influenza A (H1N1) in due coorti di topi, una con genotipo LTα$^{-/-}$, quindi priva di linfonodi e con disorganizzazione del parenchima splenico, e l'altra *wild-type* (79). I topi LTα$^{-/-}$ mostravano maggiore suscettibilità al virus. Analisi delle cellule T CD8^{+} della milza e dei polmoni rivelavano inoltre che la comparsa di linfociti T CD8^{+} specifici per il virus e di cellule T CD8^{+} secernenti IFN-γ negli animali LTα$^{-/-}$ avveniva molto in ritardo rispetto ai *wt*. Esami condotti sui lavaggi bronchiali e sul tessuto polmonare evidenziavano come i topi LTα$^{-/-}$ fossero in grado di generare linfociti T citotossici influenza-specifici, sebbene tale risposta fosse ritardata rispetto ai *wt*; gli animali LTα$^{-/-}$ erano caratterizzati altresì da un minor numero di cellule T citotossiche, a causa del più elevato grado di infiammazione polmonare. Nei topi LTα$^{-/-}$ si notava inoltre la formazione di centri germinativi nel polmone, ma non nella milza (79). In un altro modello murino di influenza, i topi *wt* e quelli LTα$^{-/-}$ ricostituiti con midollo osseo di animale *wt*

presentavano la regolare formazione di tessuto linfoide inducibile associato ai bronchi (iBALT), mentre quelli LTα$^{-/-}$ esibivano aggregati polmonari di linfociti B e T non propriamente organizzati (80). Nel 2012 si è investigata la relazione tra la deplezione di cellule T e la contestuale riduzione delle cellule fibroblastiche reticolari degli organi linfoidi in due specie di primati colpite da SIV (Virus dell'Immunodeficienza delle Scimmie) (81). La causa della perdita di cellule fibroblastiche reticolari era rintracciata nella diminuzione dei livelli di LTβ, prevalentemente prodotta dai linfociti T CD4^{+}, i quali vengono progressivamente depletati nel corso della malattia. Gli autori di questo lavoro hanno inoltre confermato che la stessa relazione di dipendenza sussiste fra i linfociti T CD4^{+} e le cellule fibroblastiche reticolari nei pazienti infettati da HIV-1 (81). Vi sono crescenti evidenze riguardo al ruolo della LT nella produzione degli IFN di tipo I (78); tale fenomeno è emerso per la prima volta grazie ad un modello murino infettato con Cytomegalovirus, nel quale, per un'efficiente induzione dell'IFN-β, era necessaria la compresenza del virus e della segnalazione mediata da LT (82).

Citochine con funzione emopoietica

Le citochine svolgono un ruolo fondamentale anche a livello del midollo osseo. In questa sede, esse regolano finemente i processi emopoietici. Alcune citochine prodotte nel corso delle risposte immunitarie innate e specifiche agiscono sul midollo osseo stimolando la produzione di leucociti per garantire l'opportuno ricambio di quelli persi durante le reazioni infiammatorie, talora instaurando anche un aumento dei leucociti circolanti rispetto ai livelli basali fisiologici (1).

Fattori stimolanti la formazione di colonie

Le cellule staminali emopoietiche e i progenitori cellulari emopoietici del midollo osseo subiscono processi di differenziazione verso uno stipite cellulare o un altro (1). I fenomeni di proliferazione e di diversificazione di tali cellule sono orchestrati dai fattori stimolanti la formazione di colonie (CSF, *Colony-Stimulating Factors*). Il loro nome deriva dall'osservazione che, una volta che le cellule staminali del midollo osseo sono poste in un mezzo di coltura semisolido in modo tale da immobilizzarle, tali citochine inducono la formazione di una colonia a partire da ogni cellula depositata nel mezzo. Il nome di ciascun CSF è dato dalla linea differenziativa che le colonie assumono quando esso è addizionato al mezzo di coltura. Sono noti tre CSF, rispettivamente chiamati GM-CSF, M-CSF e G-CSF. Essi sono secreti da linfociti T attivati, macrofagi, cellule endoteliali, e cellule stromali del midollo osseo, e agiscono sulle cellule staminali emopoietiche indirizzandole alla differenziazione in leucociti. Il G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), secreto nei focolai infettivi, stimola il midollo osseo a produrre i granulociti e a mobilizzarli in circolo (1). Il GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) induce la differenziazione delle cellule staminali del midollo osseo in granulociti e monociti ed è inoltre un attivatore dei macrofagi (1), mentre il M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) promuove la produzione da parte del midollo osseo di soli macrofagi (83). Il M-CSF è costitutivamente presente in circolo a concentrazioni rilevabili, al contrario del GM-CSF, il quale richiede uno stimolo, che può derivare ad esempio dal TNF o dall'LPS in caso di un'infezione, per poter raggiungere livelli rilevabili. Malgrado il GM-CSF e il M-CSF promuovano entrambi la formazione dei macrofagi, i loro effetti in tal senso non sono sovrapponibili. I macrofagi che discendono da precursori emopoietici del

midollo osseo murino trattati con GM-CSF secernono un profilo di citochine nettamente divergente dai macrofagi ottenuti tramite stimolazione degli stessi precursori con M-CSF (83). Oltre alla già discussa attività emopoietica, i CSF esercitano un complesso di effetti funzionali sui granulociti e sui macrofagi, favorendo la sopravvivenza, l'adesione e la chemiotassi di queste cellule, e promuovendone l'attività di fagocitosi (84). In alcuni casi, tuttavia, queste azioni potrebbero risultare nefaste per l'organismo. Ad esempio, si è scoperto che il GM-CSF, il M-CSF e l'IL-3 aumentano la produzione del virus HIV-1 in fagociti mononucleati infettati con un ceppo di HIV-1 con un tropismo per queste cellule (85).

c-kit

Il recettore tirosin-chinasico c-kit è codificato da un oncogene ed è espresso sulle cellule staminali emopoietiche e sulle cellule progenitrici emopoietiche, indicando un ruolo nella loro differenziazione e nel loro sviluppo. Il suo ligando è il fattore delle cellule staminali (SCF, *Stem Cell Factor*), una citochina prodotta dalle cellule stromali del midollo osseo in forma secreta o come proteina transmembrana. Queste due forme derivano dallo *splicing* alternativo dello stesso trascritto primario (1,86,87). Nel corso del processo differenziativo, l'espressione di tale recettore viene persa per molti tipi cellulari, tra cui i linfociti B e T (86). Tuttavia, i mastociti, gli eosinofili, una sottopopolazione di cellule NK e le cellule dendritiche continuano ad esprimere c-kit anche allo stadio pienamente differenziato. c-kit è fondamentale per lo sviluppo, la sopravvivenza e le funzioni dei mastociti. I legame di SCF a c-kit nei mastociti conduce alla loro degranulazione con rilascio di istamina e alla secrezione di citochine pro-infiammatorie e chemochine (86). SCF promuove la generazione di eosinofili agendo sui progenitori nel midollo osseo, di concerto con GM-CSF, l'IL-3 e l'IL-5 (88), ed induce inoltre la degranulazione degli eosinofili (89). Un'analisi dell'espressione genica dimostra che CSF induce una moltitudine di geni pro-infiammatori negli eosinofili, tra cui talune chemochine (89). L'espressione di c-kit è stata riscontrata anche in una particolare sottopopolazione di cellule NK, le cellule NK $CD56^{bright}$ (90). SCF potenzia l'effetto proliferativo che l'IL-2 esercita su queste cellule, ma non induce di per sé proliferazione. Le cellule NK esprimenti c-kit mostrano attività citolitica inferiore rispetto a quelle prive di tale recettore (90). I linfociti pro-T esprimono livelli elevati di c-kit, il quale svolge un ruolo cruciale nella maturazione delle cellule T nel timo (1).

Interleuchina-7

L'interleuchina-7 (IL-7) è dotata di 4 domini ad α-elica (1). Questa citochina promuove lo sviluppo e la proliferazione dei progenitori linfoidi B e T. Il suo recettore (IL-7R) comprende una subunità α, la quale si associa alla citochina, e la catena γ comune del recettore per l'IL-2 (IL-2R), che funge da trasduttore del segnale (1). Il timo è probabilmente l'organo con i più alti livelli di espressione di IL-7 (91). Nel timo postnatale e nel timo adulto, le cellule epiteliali timiche secernenti IL-7 sono massimamente rappresentate nella midollare e alla giunzione corticomidollare, laddove i progenitori linfoidi extravasano per addentrarsi successivamente nella midollare, e molto scarsamente presenti nella corticale e nella regione sottocapsulare (91). Nei linfonodi, la sorgente principale di IL-7 è costituita dalle cellule fibroblastiche reticolari (92). *In vitro*, queste cellule hanno dimostrato di essere in grado di mantenere vitali i linfociti T vergini (92). Un'altra sede di produzione dell'IL-7 è il midollo osseo, ove essa è secreta dalle cellule stromali midollari (93). Nel corso di patologie di natura allergica, si ha la formazione di

tessuto linfoide inducibile associato ai bronchi (iBALT) (94). Il mantenimento dei linfociti Th2 della memoria residenti in tali tessuti linfoidi terziari è garantito dall'IL-7 prodotta da cellule endoteliali linfatiche a fenotipo Thy1^{+} (94). L'espressione di IL-7 è stata riportata a livello delle cellule epiteliali del colon e delle cellule caliciformi intestinali umane (95). Ancor più notevole è il contestuale riscontro del recettore per l'IL-7 sui linfociti intraepiteliali della mucosa intestinale. L'IL-7 regola la proliferazione di questi linfociti (95). Negli epatociti, la segnalazione mediata da TLRs induce la produzione di IL-7 (96). Il fegato è peraltro una fonte primaria di IL-7 secreta in risposta alla stimolazione dei TLRs (96).

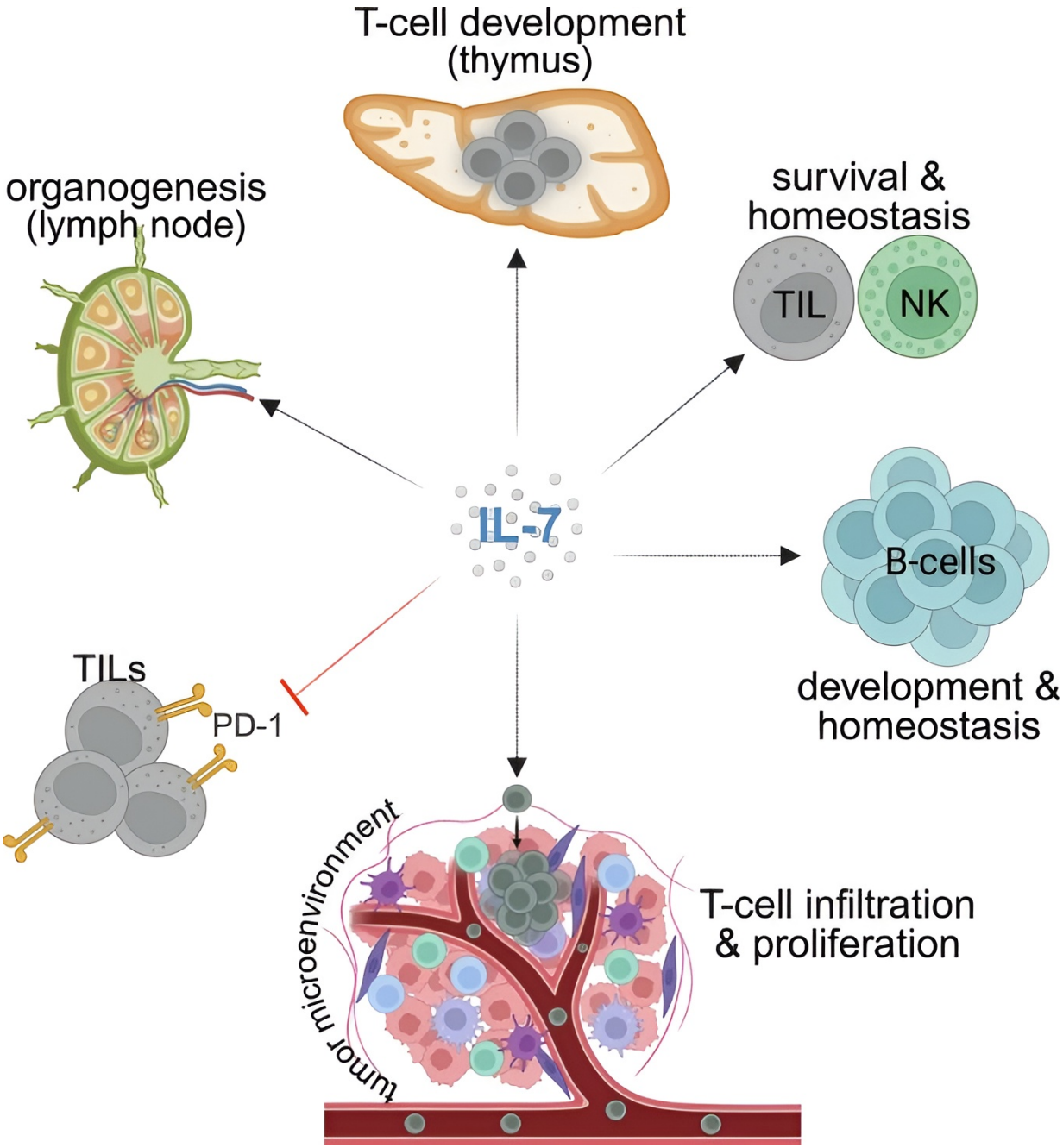

Figura 16. Sommario delle azioni dell'IL-7 sul sistema immunitario (97)**. TILs**: *Tumor-Infiltrating T cells*.

Interleuchina-3

Provvista anch'essa di 4 domini ad α-elica, l'interleuchina-3 (IL-3) agisce sui progenitori del midollo osseo, promuovendone la proliferazione e incanalandoli nella differenziazione verso tutti gli stipiti cellulari (1). L'IL-3 esplica inoltre innumerevoli altre funzioni (98). Il recettore per l'IL-3 è un eterodimero comprendente una subunità α (CD123), che riconosce specificamente la citochina, e una subunità β (CD131), con funzione di segnalazione. CD131 è anche noto come catena β comune, in quanto fa parte anche dei recettori dell'IL-5 e del GM-CSF (98). Nel topo, addizionalmente a CD131, si riscontra un'ulteriore tipologia di catena β, capace di legare direttamente l'IL-3 (99). CD123 è espresso su un vasto numero di tipi cellulari, tra cui le cellule staminali emopoietiche, i progenitori cellulari emopoietici, i mastociti, gli eosinofili, i basofili, i macrofagi, le cellule dendritiche plasmacitoidi umane, linfociti attivati e altre cellule non emopoietiche (98). Il ruolo dell'IL-3 nell'emopoiesi è stato studiato nel topo (100). La somministrazione di IL-3 ricombinante non porta a variazione del tipo e del numero di precursori nel midollo osseo, ma incrementa significativamente l'emopoiesi extramidollare, con enorme aumento dei progenitori granulocito-macrofagici, eosinofili ed eritroidi nella milza. Si è riscontrata inoltre un'infiltrazione di cellule emopoietiche nel fegato, ma queste apparivano prive di attività mitotica. Nella milza aumentava anche il numero di cellule in via di maturazione, tra cui granulociti ed eosinofili immaturi, mentre si osservava una leggera diminuzione delle stesse nel midollo osseo (100). L'IL-3 favorisce la proliferazione e la differenziazione dei mastociti murini (98), e promuove la produzione di IL-9 da parte di tali cellule attraverso un meccanismo autocrino (101). Tuttavia, i mastociti umani residenti nelle tonsille, nell'utero, nei polmoni e nella cute non esprimono CD123 (102). I basofili umani secernono IL-3 in seguito all'attivazione mediata dalle IgE, che si legano ai recettori FcεRI espressi sui basofili, e da altri stimoli (103). I linfociti T sono un'importante fonte di IL-3 nei processi infiammatori (104). I linfociti B, T $CD4^+$ e T $CD8^+$ umani attivati esprimono CD123, e l'IL-3 promuove la sopravvivenza e la proliferazione di queste cellule e l'espressione di IL-6 e IL-13 nei linfociti T $CD4^+$. L'IL-2 accresce l'espressione di CD123 nelle cellule T $CD8^+$ (104). Nell'uomo, l'IL-3 promuove inoltre la sopravvivenza delle cellule plasmacitoidi dendritiche (105). L'IL-3 potenzia l'adesione e migrazione transendoteliale degli eosinofili (106), e ne sostiene l'attività citotossica verso elminti complessati con anticorpi (107).

MATURAZIONE DEI LINFOCITI

Il processo di maturazione dei linfociti a partire dalle cellule staminali emopoietiche del midollo osseo si sostanzia in una successione di eventi biochimici (1). I progenitori cellulari linfoidi che discendono da tali cellule staminali possono differenziarsi in linfociti T, B e cellule NK. I progenitori linfoidi sono soggetti a una notevole proliferazione prima della loro differenziazione, ai fini di raggiungere un elevato grado di diversificazione della specificità antigenica nei linfociti maturi. L'IL-7 ha un ruolo fondamentale nell'espansione mitotica dei progenitori. L'espressione del recettore per l'antigene è l'evento principale della maturazione dei linfociti. La diversificazione del repertorio linfocitario avviene grazie ad un fenomeno di ricombinazione somatica caratteristico dei linfociti, la ricombinazione V(D)J. Tale processo è catalizzato da un insieme di enzimi che ricombinano casualmente tra loro segmenti non congiunti di DNA in una serie infinita di possibili combinazioni mediante l'eliminazione delle parti tra essi interposte. Il recettore antigenico espresso sui linfociti immaturi trasduce segnali intracellulari che promuovono la sopravvivenza, la proliferazione e la prosecuzione della

maturazione. La piena casualità della ricombinazione somatica determina l'insorgenza di cloni linfocitari sia utili sia aberranti. L'eliminazione di quest'ultimi è garantita dai processi di selezione che si verificano negli organi linfoidi primari. Con la selezione positiva, i linfociti i cui recettori non sono in grado di legarsi ad altre molecole non ricevono segnali di sopravvivenza attraverso i recettori stessi e vanno conseguentemente incontro alla morte. La selezione negativa determina invece la morte dei linfociti autoreattivi, ossia quelli che riconoscono con elevata avidità antigeni autologhi presenti negli organi linfoidi primari, mediante l'innesco della cascata apoptotica. La maturazione si conclude con l'acquisizione della maturazione funzionale, attuata mediante l'espressione dell'apparato molecolare che consente ai linfociti di attuare appieno le funzioni effettrici (1).

Maturazione dei linfociti B

La maturazione dei linfociti B ha luogo interamente nel midollo osseo dopo la nascita, e nel fegato durante la vita intrauterina (1). Le cellule pro-B, che rappresentano i primi progenitori della linea differenziativa B, non esprimono Ig, ma manifestano molecole di superficie distintive dei linfociti B, tra cui CD10. Lo stadio successivo corrisponde alle cellule pre-B, le quali sintetizzano nel citoplasma la catena pesante μ. Questa si può associare alla catena leggera sostitutiva, una proteina omologa alle catene leggere κ e λ ma interamente costante e priva delle regioni variabili, a formare il recettore pre-B. Esso è espresso a basse concentrazioni in superficie in associazione alle catene Igα e Igβ, poste a trasdurne il segnale. Le cellule pre-B si evolvono in linfociti B immaturi, i quali esprimono una catena leggera κ o λ in associazione a μ. La risultante IgM di membrana svolge l'esclusivo ruolo di selezione negativa attraverso l'interazione con antigeni *self* generalmente polivalenti presenti nel midollo osseo. Infine, le cellule B iniziano ad esprimere anche IgD in associazione alle IgM, raggiungendo contestualmente la maturità funzionale. Si parla a tal punto di linfociti B vergini maturi, i quali, immettendosi in circolo mediante i sinusoidi del midollo osseo, possono intraprendere la ricircolazione tra il sangue e gli organi linfoidi (1).

Maturazione dei linfociti T: aspetti biochimici, anatomici e istologici

I precursori cellulari linfoidi si originano nel midollo osseo dopo la nascita, mentre sono prodotti dal fegato nella vita fetale. Una volta rilasciati nella circolazione sistemica da questi organi, tali progenitori extravasano nel timo (108). L'organizzazione istologica del timo è responsabile della proliferazione e della maturazione dei linfociti (1). I mezzi fondamentali per l'espletamento di queste funzioni sono la presentazione di molecole MHC I e II complessate a peptidi *self*, e la secrezione di citochine, tra le quali l'IL-7 riveste un ruolo principale. Tali processi sono governati dalle cellule non linfoidi del timo, di cui le cellule epiteliali timiche, le cellule dendritiche e i macrofagi (1). Le cellule dendritiche sono abbondanti alla giunzione corticomidollare e nella midollare (1), mentre i macrofagi sono localizzati sia nella midollare sia nella corticale (1,109). A livello della corticale profonda e della regione sottocapsulare, i macrofagi fagocitano massivamente corpi apoptotici derivanti dai timociti defunti (109). Da un punto di vista immunoistochimico, le cellule epiteliali timiche si possono suddividere in 4 sottotipi, ossia le corticali sottocapsulari, le corticali interne, le midollari e le cellule dei corpuscoli di Hassall (109). La localizzazione timica è consentita dall'interazione della molecola PSGL-1, espressa dai precursori, con la P-selectina esposta sulle cellule endoteliali

timiche (110). Il reclutamento delle cellule nel timo è ulteriormente favorito dalle chemochine che si legano ai recettori CCR7 e CCR9 (111–113). Sotto l'influenza di ligandi di Notch e dell'IL-7 prodotta dalle cellule epiteliali della corticale del timo, i progenitori linfoidi provenienti dal midollo osseo vengono indirizzati verso la linea differenziativa T (108,114,115). I timociti doppio-negativi rappresentano il primo stadio maturativo dei linfociti T, e sono così chiamati poiché non esprimono alcuno dei co-recettori CD4 e CD8 (108). Lo sviluppo dei timociti doppio-negativi è suddivisibile in 4 stadi. Nel primo stadio (DN1), essi sono connotati dall'assenza del TCR, di CD3 e della catena ζ. Raggiunto lo stadio DN3, i timociti doppio-negativi manifestano il recettore pre-T. Tale complesso è costituito dalla catena β del TCR associata alla catena pre-Tα, una proteina non polimorfa, alla catena ζ e a CD3. Dopo lo stadio DN4, i precursori linfocitari passano allo stato di doppia positività, con l'espressione di entrambi i co-recettori CD4 e CD8. Nel corso della fase di doppia positività, nei timociti si compie l'espressione del complesso TCR maturo, grazie all'espressione della catena α. I timociti doppio-positivi vanno incontro alla selezione positiva: i timociti che riconoscono a bassa avidità complessi MHC *self* ricevono segnali di sopravvivenza, con la contestuale morte delle cellule che non riconoscono MHC *self*. I timociti che sopravvivono si evolvono in timociti singolo-positivi, ovvero esprimenti soltanto il CD4 oppure il CD8, ma non entrambi i recettori (108). Lo *status* di singola positività è acquisito grazie al tipo di co-recettore che la molecola MHC impegna assieme al TCR: ad esempio, i complessi MHC I si associano a CD8, quindi il timocita coinvolto perde CD4 per "non uso", assumendo il fenotipo $CD4^{-}CD8^{+}$ (1). Nella midollare del timo, i timociti singolo-positivi $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ subiscono la selezione negativa, con l'eliminazione dei timociti autoreattivi (1). Le cellule epiteliali timiche della midollare espongono in maniera promiscua antigeni tessuto-specifici (116). Il riconoscimento ad elevata avidità di questi antigeni da parte dei timociti porta all'eliminazione di quest'ultimi per apoptosi, garantendo la tolleranza centrale al *self* (1). Parallelamente all'evoluzione fenotipica dei timociti, si verifica la loro maturazione funzionale, cosicché, al termine dei processi, si ottengono linfociti T vergini $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ pienamente competenti (1). I processi di maturazione dei linfociti T esprimenti il TCRγδ si svolgono nel timo in modo analogo a quanto visto per le cellule $TCR\alpha\beta^{+}$. L'espressione del TCRαβ e quella del TCRγδ sono mutualmente esclusive. I linfociti $TCR\alpha\beta^{+}$ e i $TCR\gamma\delta^{+}$ appartengono a linee differenziative distinte, discendenti dallo stesso progenitore (1).

Maturazione delle cellule T NK

Le cellule T NK, a cui si era brevemente fatto riferimento in precedenza, sono una popolazione di linfociti T funzionalmente distinta dalle cellule T convenzionali (117). Esse si caratterizzano soprattutto per la presenza di marcatori fenotipici tipici delle cellule NK e per il repertorio del loro TCR, più ristretto rispetto a quello dei linfociti T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$. Le cellule T NK non sono ristrette per MHC I o II, e il loro recettore riconosce la molecola di superficie CD1d, simile all'MHC I e caricata con antigeni glicolipidici. Pur maturando anch'esse nel timo, le cellule T NK richiedono un programma di maturazione diverso da quello dei linfociti T convenzionali. Le cellule T NK si sviluppano grazie alla presentazione di antigeni glicolipidici *self* da parte di timociti doppio-positivi attraverso molecole CD1d (117).

Migrazione dei timociti all'interno del timo

La localizzazione dei precursori linfocitari nelle diverse zone del parenchima del timo è stadio-specifica: i timociti si distribuiscono in ben determinate aree parenchimali in funzione del loro grado evolutivo, grazie al percorso che essi compiono all'interno dell'organo nel corso della maturazione (118). Nel timo postnatale, i progenitori provenienti dal midollo osseo si introducono nel parenchima in una sottile regione della corticale perimidollare. Mentre i precursori si evolvono in timociti DN1, essi iniziano la loro migrazione verso l'esterno della corticale, fino ad accumularsi nella regione sottocapsulare quando si trovano già nella fase DN3. La zona sottocapsulare costituisce un microambiente atto ad accogliere le fasi tardive della proliferazione dei timociti, coincidenti con gli ultimi stadi doppio-negativi e con l'inizio dello stato di doppia positività (118). Con la selezione positiva e il passaggio a singolo-positivo, i timociti incrementano la propria espressione del recettore CCR7, i cui ligandi CCL19 e CCL21 inducono la migrazione dei precursori linfocitari dalla corticale alla midollare (119). Conseguentemente, i timociti singolo-positivi si collocano prevalentemente nella midollare (109). Si è osservato che i linfociti T maturi fuoriescono dal timo introducendosi nello spazio perivascolare ed infiltrandosi sia nei vasi linfatici sia nelle venule post-capillari (120,121).

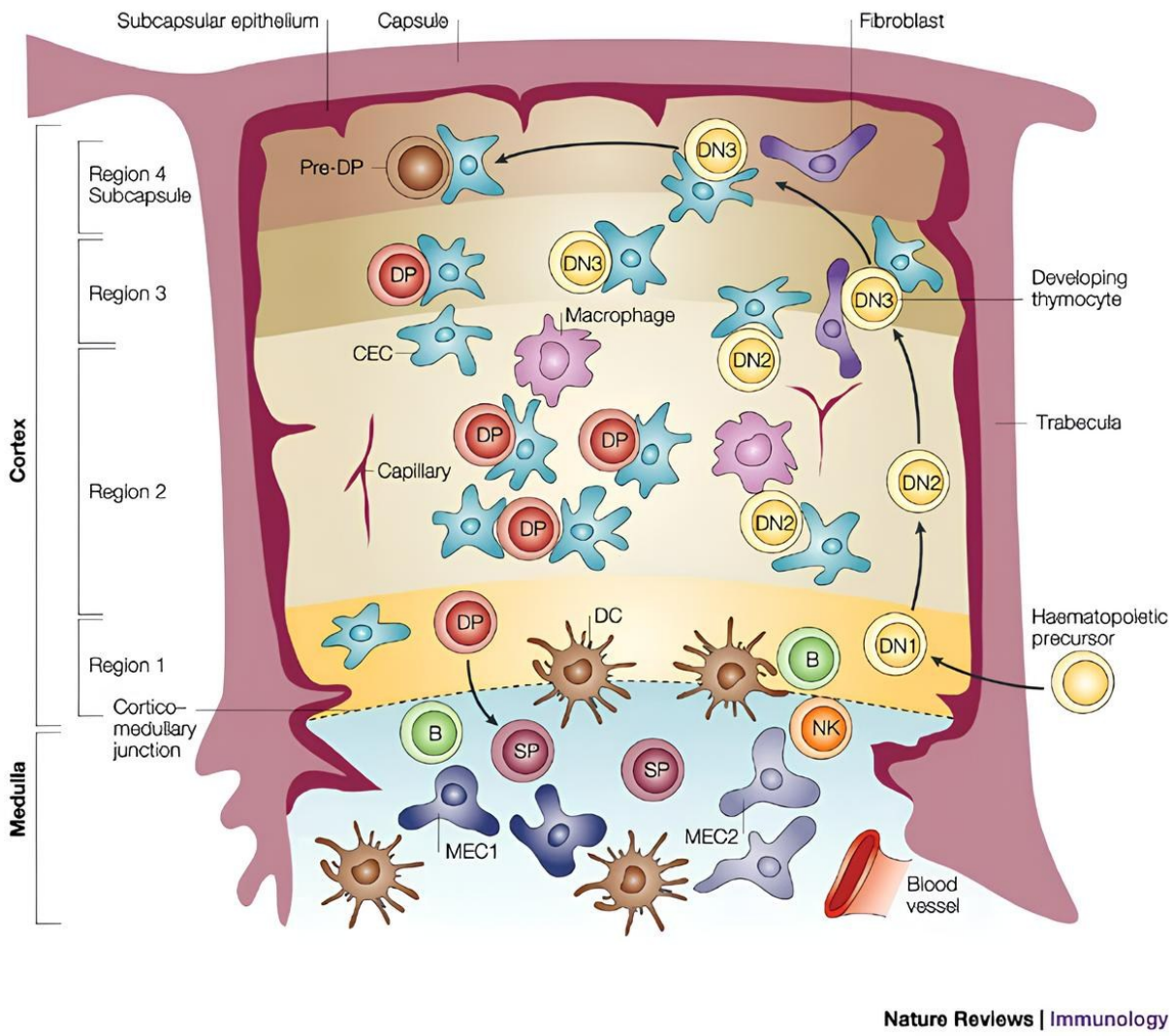

Figura 17. Maturazione dei linfociti T nel timo (122)**.** I precursori linfocitari accedono al parenchima timico attraverso i vasi sanguigni nella giunzione cortico-midollare. I timociti doppio-negativi migrano allora verso gli strati superficiali della corticale. Nella regione sottocapsulare avviene la transizione tra lo stadio DN3 e la doppia-positività. I timociti doppio-positivi si spostano dunque in profondità nella corticale, e nel corso di tale tragitto avviene la selezione positiva. Convertiti alla singola-positività, i timociti accedono alla midollare e subiscono la selezione negativa. I linfociti T pienamente competenti fuoriescono dalla midollare tramite i vasi sanguigni e linfatici.

ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI T

Dal punto di vista biochimico, l'attivazione dei linfociti T necessita di un primo segnale, prodotto dal legame del TCR all'antigene, e da un secondo generato da molecole costimolatorie (1). Qualora il linfocita T vergine ricevesse il primo segnale in mancanza del secondo, la cellula T potrebbe morire per apoptosi oppure sprofondare in uno stato di anergia. Una delle più conosciute vie costimolatorie coinvolge la molecola CD28. CD28, espresso sui linfociti T, si lega alle molecole CD80 e CD86 presenti sulla superficie dei macrofagi, delle cellule dendritiche e dei linfociti B, che rappresentano le APC professionali. Queste APC esprimono bassi livelli basali di tali molecole costimolatorie, ma la presenza di prodotti microbici (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), il legame del loro recettore CD40 al CD40L dei linfociti, l'IFN-γ e, nelle cellule B, anche l'aggregazione del recettore per

l'antigene, producono un grande incremento dell'espressione di molecole B7. L'induzione di queste due molecole è temporalmente differenziata: CD86 è espressa entro 6 ore dalla stimolazione, mentre CD80 impiega almeno 24 ore per fare la sua comparsa. Un'altra molecola costimolatoria è ICOS (*Inducible T-cell COStimulator*), omologo a CD28. ICOS è espresso sulla membrana del linfocita T a seguito dell'attivazione. CD2 è un altro costimolatore presente sui linfociti T, che ha come ligando sulle APC la molecola LFA-3 nei primati, e CD48 nei roditori. CD2 promuove l'attivazione in modo analogo a CD28, e può compensare ad eventuali carenze di quest'ultimo. CD28 e CD2 trasducono segnali che incrementano la produzione di citochine, tra cui l'IL-2, e che favoriscono la sopravvivenza del linfocita, quali l'aumento dell'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-x. Il sistema di segnalazione di CD40 e CD40L favorisce l'attivazione dei linfociti T in modo indiretto, generando segnali che nella APC stimolano l'espressione di molecole B7 e la secrezione di IL-12. L'espressione delle molecole costimolatorie è finemente regolata, allo scopo di coordinare l'appropriato sviluppo delle risposte delle cellule T. In questo contesto, la stimolazione dell'espressione di molecole costimolatorie sulle APC da parte di PAMPs, contrapposta all'estrema paucità di costimolatori in assenza di dette sostanze, rappresenta un espediente per circoscrivere l'insorgenza della risposta T a situazioni di minaccia da parte di un agente estraneo, contribuendo al mantenimento della tolleranza al *self*. Invero, in condizioni fisiologiche, eventuali cellule T non potrebbero venire effettivamente attivate data l'assenza di costimolazione, divenendo anergiche (1).

Primo segnale per l'attivazione dei linfociti T: il riconoscimento dell'antigene

Il riconoscimento antigenico da parte del TCR avvia una risposta intracellulare che porta all'espressione di numerosi geni e alla proliferazione cellulare (1). Le vie di trasduzione del segnale iniziano pochi minuti dopo il riconoscimento, portando entro poche ore a modificazioni della trascrizione genica. Si ha l'attivazione delle vie delle chinasi Ras-MAP, Ras-SAP, e protein-chinasi C (PKC), e della via della calcineurina. Queste cascate attivano fattori di trascrizione. Le regioni ITAM comprese nelle porzioni intracellulari delle catene ζ del complesso TCR, fosforilate dalle chinasi Lck e Fyn a seguito del riconoscimento dell'antigene, divengono una base di aggancio per la tirosin-chinasi ZAP-70, non appartenente alla famiglia Src. ZAP-70 contiene due domini SH2 (*Src Homology-2*), ognuno in grado di legarsi ad una tirosina fosforilata, sicché ad ogni ITAM si lega un'unità di ZAP-70. A tal punto, Lck, trovandosi in prossimità di ZAP-70, la fosforila, attivandola. L'effettivo inizio della cascata di attivazione può richiedere un certo quantitativo di unità di ZAP-70 attivate. Pertanto, potrebbero essere necessari ripetuti contatti tra linfocita e antigene, in modo tale da raggiungere un appropriato livello di fosforilazione delle ITAM delle catene *ζ*. Nella regolazione delle varie proteine che intervengono nella cascata di trasduzione, sono implicate tirosin-chinasi e tirosin-fosfatasi che, fosforilando e defosforilando i propri substrati, possono esercitarvi effetti attivanti o inibitori. Un esempio è la già trattata molecola CD45. ZAP-70, una volta attivata, fosforila delle proteine adattatrici che fungono da piattaforme di legame per ulteriori proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Due importanti proteine adattatrici sono la molecola di membrana LAT (*Linker of Activation for T cells*) e la proteina citosolica SLP-76 (*SH2 domain-containing Leukocyte Protein of 76kDa*). Queste ultime reclutano altre proteine adattatrici, tra cui Grb-2, anch'essa dotata di domini SH2 e fosforilata da ZAP-70 (1).

Vie di segnalazione di Ras e Rac

La proteina Ras si attiva grazie all'interazione con le proteine adattatrici fosforilate (1). Ras fa parte di una famiglia di proteine dotate di attività GTPasica intrinseca, ed è ancorata alla membrana tramite legami covalenti con lipidi. Allo stato inattivo, Ras è occupata da una molecola di GDP. Allo scambio di questa con un'unità di GTP, Ras acquisisce la capacità di attivare allostericamente altre proteine. La proteina Sos, reclutata da Grb-2 a seguito del riconoscimento antigenico, agisce su Ras scambiandone l'unità di GDP con GTP. Ras-GTP avvia la cascata delle chinasi MAP (*Mitogen-Associated Protein*), che prevede l'attivazione sequenziale di alcune chinasi mediante fosforilazione. ERK, una di queste chinasi MAP, attiva Elk, che agisce come fattore di trascrizione per Fos, componente del fattore di trascrizione AP-1 (*Activation Protein-1*). Ras-GTP promuove anche la riorganizzazione del citoscheletro, coadiuvando l'assemblaggio di co-recettori e proteine adattatrici al complesso TCR in un aggregato posto all'interfaccia del linfocita con la APC. Le proteine adattatrici fosforilate associate al complesso TCR dopo il legame all'antigene reclutano anche Vav, un altro scambiatore GDP-GTP che attiva un altro membro della famiglia Ras, la proteina Rac. Rac-GTP aziona una separata cascata MAP chinasica che esita nell'attivazione della chinasi JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). JNK è tipicamente attivata da citochine pro-infiammatorie e da stimoli nocivi, tra cui radiazioni e stress ossidativo. JNK fosforila il secondo componente del fattore AP-1, noto come c-Jun. Le chinasi ERK e JNK vengono disattivate da fosfatasi tirosina/treonina indotte dalle stesse ERK e JNK nell'ambito di un meccanismo a feedback negativo (1).

Vie di segnalazione dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3) e del diacilglicerolo (DAG)

ZAP-70, una volta entrata in azione, attiva per fosforilazione l'isoforma γI della fosfolipasi C (PLC), reclutato a livello del foglietto interno di membrana dalle proteine adattatrici fosforilate come LAT (1). PLCγI scinde il fosfatidilinositolo 4,5-difosfato (PIP2) in diacilglicerolo (DAG) e inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3). L'IP3 è responsabile dell'aumento dei livelli citosolici di Ca^{2+} che si osservano dopo pochi minuti dal riconoscimento dell'antigene, e la concentrazione di Ca^{2+} permane elevata per oltre un'ora. In conseguenza a tale incremento di Ca^{2+}, ioni Ca^{2+} si legano alla calmodulina, attivandola. Tra le proteine che la calmodulina aziona vi è la calcineurina, una fosfatasi serina/treonina. Un altro degli effetti dell'innalzato livello di Ca^{2+} è la traslocazione di una delle isoforme di PKC a livello del foglietto interno di membrana, laddove vi è un contestuale accumulo di DAG prodotto da PLCγI. DAG agisce da attivatore di PKC, la quale partecipa alla generazione dei fattori di trascrizione (1).

Fattori di trascrizione coinvolti nell'attivazione dei linfociti T

Queste quattro distinte vie di segnalazione che partono dal legame dell'antigene al TCR attivano fattori di trascrizione (1). Questi agiscono legandosi ai promotori dei geni, a sequenze *enhancer*, o a sequenze a monte dei geni. Ognuna di queste vie di trasduzione dà luogo a diversi fattori di trascrizione, e la necessità di più fattori per mediare l'attivazione del linfocita

spiega l'esistenza di ben quattro vie. I principali fattori di trascrizione che operano l'attivazione dei linfociti T sono AP-1, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), NF-κB (Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells). NFAT è necessario per l'espressione di citochine tra cui IL-2, IL-4 e TNF. Esistono quattro tipi di NFAT, codificati da quattro diversi geni. I più rilevanti nei linfociti T sono NFATp e NFATc. NFAT esiste nel citosol in forma inattiva, fosforilata, in assenza di stimolazione antigenica. Solo dopo il riconoscimento, la calcineurina defosforila NFAT, attivandolo. Avvenuta la traslocazione nel nucleo, NFAT si lega a sequenze consenso della regione regolatrice dei geni delle citochine, spesso in associazione ad altri fattori, tra cui AP-1. L'acronimo AP-1 è riferito a una famiglia di fattori di trascrizione eterodimerici, i cui monomeri sono tra loro uniti da particolari domini a cerniera di leucina. Il fattore AP-1 maggiormente caratterizzato è costituito dalle proteine Fos e Jun. Il riconoscimento dell'antigene porta alla comparsa di molecole di AP-1 nel nucleo, segnando una convergenza di due distinte vie di segnalazione. Infatti, la trascrizione del gene Fos è promossa dalla via a cui fa capo Ras-GTP e da PKC, mentre la fosforilazione di Jun è attuata da JNK. AP-1 mostra una potente attività di promozione della trascrizione, e si associa frequentemente ad altri fattori di trascrizione, tra cui NFAT. NF-κB è un fattore di trascrizione importante per la sintesi di citochine. Esso si presenta in forma omodimerica o eterodimerica, ed è coinvolto nella trascrizione di molti geni in diversi tipi di cellule. Nel linfocita T non stimolato dall'antigene, NF-κB si trova complessato con proteine inibitorie, chiamate IKB. Dopo il contatto del TCR con l'antigene, IκB sono fosforilati in serina da specifiche chinasi, in un processo in parte dipendente da PKC. Gli IKB fosforilati subiscono legame con ubiquitina e sono degradati dal proteasoma. Svincolato dagli IκB, NF-κB si trasferisce nel nucleo, ove favorisce la trascrizione di geni di citochine e dei loro recettori (1).

Secondo segnale per l'attivazione dei linfociti T: le molecole costimolatorie

I costimolatori potenziano la generazione dei fattori di trascrizione in sinergia con i segnali trasmessi dal TCR (1). Nello specifico, le molecole costimolatorie possono influenzare le stesse vie innescate dal TCR, agire su vie di segnalazione che convergono in quelle del TCR, attivare vie totalmente indipendenti da quelle del TCR, o inibire lo spegnimento di talune cascate di trasduzione. CD28, a seguito del legame con molecole B7, può attivare la chinasi PI-3, facilitando lo scambio di GDP con GTP a livello di Ras, e promuove anche vie alternative per l'attivazione di Vav, intervendendo dunque sulla via di Rac. CD28 attiva inoltre una forma di NF-κB in grado di legarsi ad una regione del promotore dell'IL-2, nota come elemento responsivo a CD28 (CD28RE). CTLA-4, che lega le molecole B7 ma ha effetti opposti a CD28, sopprime l'attivazione della cellula T (1).

Ligandi peptidici alterati (APL)

Modificazioni dei residui del peptide antigenico riconosciuti dal TCR possono condurre ad un'alterazione della risposta dei linfociti T (1). Tali peptidi modificati prendono il nome di ligandi peptidici alterati (APL). Taluni cambiamenti della sequenza amminoacidica a cui si lega il TCR possono portare alla produzione di solo una parte delle citochine elicitate dal peptide nativo, o comunque a una risposta quantitativamente inferiore. Tali peptidi prendono il nome di peptidi agonisti parziali. Altri peptidi determinano invece un segnale negativo, che spegne la

risposta al peptide originario. Si parla in questo caso di peptidi antagonisti. La modificazione degli antigeni è una risorsa talvolta sfruttata dai microrganismi per trarre un vantaggio sull'ospite ed evadere le difese immunitarie (1). Tale meccanismo è stato riportato nel caso dell'HBV: il virus è in grado di generare APL antagonisti che smorzano l'attività di linfociti T citotossici specifici per il virus (123).

Aspetti biochimici e istologici dell'attivazione dei linfociti T: proliferazione, differenziazione e declino

Dopo il riconoscimento dell'antigene, una delle prime risposte che si osservano nei linfociti T è la secrezione di citochine e l'aumento dell'espressione di recettori per le citochine (1). Tali cambiamenti sono dovuti all'espressione di geni precedentemente silenti. I linfociti T helper effettori secernono molte citochine, le quali mediano le risposte effettrici dell'immunità che queste cellule coordinano. Una citochina con un ruolo importante nell'attivazione delle cellule T è l'IL-2. Essa è il principale fattore di crescita delle cellule T. Tali cellule, una volta riconosciuto l'antigene, iniziano a secernere IL-2 e ad esprimere i relativi recettori di membrana, al punto che la catena α del recettore dell'IL-2, nota come CD25, rappresenta un marcatore specifico per l'identificazione dei linfociti T attivati. Il legame di tale citochina al suo recettore stimola la proliferazione della cellula: si tratta sostanzialmente di una via di segnalazione autocrina. La proliferazione di un linfocita T si concretizza nella sua espansione clonale, ossia la produzione di un elevato numero di cellule T specifiche per l'antigene riconosciuto. I linfociti T attivati vanno incontro anche ad una differenziazione: si evolvono in cellule effettrici dotate di funzioni diverse. La differenziazione dei linfociti T $CD4^+$ dà luogo a diverse sottopopolazioni, ciascuna secernente un distinto spettro di citochine, quindi in grado di espletare funzioni differenti. I linfociti T $CD8^+$ si differenziano in linfociti T citotossici effettori, idonei a uccidere cellule che presentino il complesso MHC I-peptide da essi riconosciuto. La differenziazione implica l'attivazione della trascrizione di geni codificanti molecole relative a funzioni effettrici. Queste includono citochine, proteine di membrana e, nel caso delle cellule T citotossiche, proteine citotossiche. Le funzioni effettrici hanno inizio quando linfociti T effettori riconoscono l'antigene specifico. I linfociti T *helper* rispondono secernendo citochine che agiscono sulle stesse cellule T, sui linfociti B, sui macrofagi, sui granulociti, sulle cellule endoteliali. Questo complesso di molecole promuove e regola le risposte immunitarie e infiammatorie. I linfociti T *helper* attivati esprimono CD40L, che lega la molecola CD40 espressa su macrofagi e linfociti B, attivando queste ultime cellule. A tal proposito, appare singolare la relazione che collega i linfociti T *helper* con i macrofagi e le cellule B. Da un lato, macrofagi e linfociti B presentano l'antigene ai T *hepler*, attivandoli. Dall'altro le cellule T *helper* stimolano l'attività fagocitica dei macrofagi e la risposta anticorpale dei linfociti B mediante segnali umorali e di membrana. La funzione effettrice dei linfociti T citotossici comprende, oltre all'uccisione di cellule tumorali o infettate da parassiti intracellulari, la produzione di citochine. La risposta delle cellule T, una volta instauratasi, è soggetta ad un lento declino, caratterizzato dalla morte per apoptosi della maggior parte delle cellule T attivate. Tale progressiva deplezione si deve alla decrescente stimolazione da parte dell'antigene, essendo questo gradualmente eliminato. Assieme all'antigene, vengono a mancare anche quei segnali di sopravvivenza dati dalle citochine e dalle molecole costimolatorie. Il declino delle risposte T è funzionale al ripristino dell'omeostasi del sistema immunitario (1).

Linfociti T della memoria

Una parte della progenie dei linfociti T attivati si differenzia in cellule T della memoria (1). Queste sono responsabili della risposta immunitaria secondaria, ossia la reazione rapida, potenziata e specifica che si verifica alla nuova esposizione allo stesso antigene. Nonostante la gran parte dei linfociti T effettori scompaia al più entro alcune settimane, le cellule T della memoria sono in grado di sopravvivere per lungo tempo dopo l'inizio della risposta immunitaria, anche in assenza di stimolazione antigenica. I linfociti T della memoria si accumulano nel corso della vita, rispecchiando la storia naturale di incontri con gli antigeni. Le cellule T della memoria esprimono, al pari dei linfociti T effettori, grandi quantità di integrine e CD44, che permettono la migrazione e la permanenza nei focolai infiammatori. Al contempo, non esprimono però marcatori di attivazione, quali CD25, e ciò riflette lo stato di quiescenza funzionale di tali cellule. Le loro funzioni effettrici si esplicano soltanto alla riesposizione all'antigene (1).

Sottopopolazioni di linfociti T

A seconda della tipologia di antigeni da cui vengono stimolati, i linfociti T *helper* $CD4^+$ si possono differenziare in numerose sottopopolazioni che si distinguono tra loro sulla base della gamma di citochine che secernono e quindi, delle funzioni effettrici che esplicano (1). Tra le sottopopolazioni oggi maggiormente caratterizzate figurano i linfociti Th1 e i linfociti Th2. Le cellule Th1 si identificano per la produzione di IFN-γ, mentre le cellule Th2 sono note per secernere IL-4 e IL-5. Le sottopopolazioni Th1 e Th2 si riscontrano molto spesso nel corso dei fenomeni infiammatori cronici, ove il bilancio di queste due sottopopolazioni è fondamentale per determinarne la risoluzione o un'evoluzione patologica. Le cellule Th1 e Th2 non esibiscono tra di loro differenze fenotipiche di rilievo, fatto salvo per una diversa espressione di recettori per le citochine. Questi parametri sono comunque instabili e correlati allo stato di attivazione del linfocita, pertanto non sono validi come marcatori fenotipici. Le citochine rilasciate dalle cellule Th1 e Th2 non mediano soltanto le loro funzioni effettrici, ma promuovono l'espansione della relativa sottopopolazione. Invero, l'IFN-γ induce la differenziazione di ulteriori linfociti T *helper* in cellule Th1 e l'IL-4 ne promuove invece la trasformazione in senso Th2. Contestualmente, l'IL-10 secreta dalle cellule Th2 inibisce l'attivazione dei linfociti Th1. In sostanza, dunque, ciascuna di queste due sottopopolazioni, per mezzo delle citochine prodotte, alimenta circuiti di auto-amplificazione e contrasta l'espansione dell'altra. Di conseguenza, nel corso delle reazioni infiammatorie, quando una delle due sottopopolazioni diviene prevalente, la risposta si orienta sempre maggiormente verso di essa. Tale polarizzazione risulta particolarmente evidente nelle infezioni croniche e nelle patologie caratterizzate da una prolungata esposizione ad antigeni ambientali. Le cellule Th1 e Th2 esibiscono diversi regimi di migrazione nei focolai infiammatori. Ciò è dovuto ai loro differenti profili di legame alle selectine dell'endotelio e alle divergenti sensibilità alle chemochine. I linfociti Th1 e Th2 originano entrambi da linfociti T $CD4^+$ vergini. A propellere la differenziazione verso l'una o l'altra sottopopolazione è l'entità degli stimoli, principalmente rappresentati dalle citochine, che agiscono sulle cellule T helper vergini. Mentre l'IL-12 costituisce il più importante induttore della differenziazione in cellule Th1, l'IL-4 è il principale promotore della diversificazione Th2. La differenziazione in cellule Th1 si verifica sovente a causa di infezioni da microrganismi che attivano o invadono i macrofagi oppure che attivano le cellule NK. Tipici esempi di questi sono i virus, i micobatteri e taluni protozoi. La chiave di

questo meccanismo è la secrezione di IL-12 nel corso della risposta innata. Alcuni agenti patogeni inducono direttamente la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi, mentre altri, tra cui i virus, stimolano le cellule NK a secernere IFN-γ, il quale attiva a sua volta i macrofagi, scatenando in tal modo la sintesi dell'IL-12. Questa citochina si lega al suo specifico recettore presente sui linfociti T $CD4^+$, la cui espressione è indotta dalla stimolazione antigenica, con la conseguente attivazione di STAT4 (1). Questo fattore di trascrizione ha dimostrato un ruolo essenziale nella differenziazione dei linfociti T $CD4^+$ in senso Th1 (124). La differenziazione in cellule Th2 è invece un tratto distintivo delle risposte alle infezioni da elminti e delle reazioni allergiche (1). Queste patologie sono caratterizzate da una stimolazione cronica dei linfociti T e da un marginale coinvolgimento dei macrofagi. L'IL-4, legandosi al proprio recettore sui linfociti T $CD4^+$, attiva STAT6, il quale induce la trascrizione dei geni fondamentali per la trasformazione in Th2 (1). L'IL-4 che induce la differenziazione Th2 può essere rilasciata dai mastociti (1), dai basofili (125), dalle cellule T NK (126), e dagli stessi linfociti T $CD4^+$ vergini (127). L'IL-4 secreta da quest'ultimi agisce come mediatore autocrino (127). Il profilo di citochine non rappresenta tuttavia l'unico fattore che manovra la differenziazione dei linfociti T *helper*. Un altro importante elemento è l'intensità della stimolazione antigenica (1). Nel 1995, uno studio *in vitro* ha dimostrato che linfociti T $CD4^+$ vergini murini stimolati con alte dosi di un antigene opportunamente presentato da APC si differenziano in cellule Th1, mentre in presenza di dosi inferiori dello stesso antigene essi si evolvono in linfociti Th2 (128). Un lavoro del 2014 sulla stessa materia ha confermato i risultati del precedente, evidenziando inoltre come l'intensità della stimolazione antigenica da parte delle cellule dendritiche, che deriva in ultima analisi dal dosaggio di antigene, sia ancor più importante dell'effetto degli adiuvanti nel condizionare la polarizzazione Th1 o Th2 (129). Infatti, quando le cellule dendritiche trasmettono un segnale antigenico di elevata intensità ai linfociti T $CD4^+$, la tendenza di quest'ultimi è di differenziarsi in cellule Th1, indipendentemente dalla presenza di papaina, adiuvante che promuove la differenziazione Th2. Qualora invece il segnale delle cellule dendritiche avesse più bassa intensità, i linfociti T andrebbero più favorevolmente incontro alla trasformazione in Th2, a prescindere dal tipo di adiuvante aggiunto (129). Altri fattori che influenzano la differenziazione Th1 o Th2 sono le molecole costimolatorie e la costituzione genetica del soggetto (1). Simili fenomeni di differenziazione in sottopopolazioni caratterizzate da una diversa produzione di citochine si riscontrano anche nei linfociti T $CD8^+$ (130).

ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI B E RISPOSTE ANTICORPALI

Gli antigeni contro i quali i linfociti B possono scatenare una risposta anticorpale si suddividono in antigeni timo-dipendenti e timo-indipendenti (1). Gli antigeni timo-dipendenti sono quelli di natura proteica, e affinché ad essi si sviluppi una risposta anticorpale è indispensabile la cooperazione dei linfociti T *helper*. Gli antigeni timo-indipendenti comprendono polisaccaridi, lipidi e acidi nucleici, e la risposta umorale a questi avviene indipendentemente dalle cellule T. Le risposte anticorpali si originano negli organi linfoidi secondari, e più precisamente nella milza per gli antigeni circolanti nel sangue, e nei linfonodi e nei tessuti linfoidi associati alle mucose per gli antigeni penetrati attraverso gli epiteli. Gli anticorpi secreti accedono al lume degli organi mucosi ed entrano nel circolo sistemico,

distribuendosi ampiamente nei fluidi biologici, mentre le cellule che li producono permangono negli organi linfoidi secondari e nel midollo osseo (1).

Primo segnale di attivazione dei linfociti B: il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti B

Il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti B è attuato mediante il legame dell'antigene al recettore delle cellule B (BCR). Il BCR trasduce a livello intracellulare la cascata di segnali che portano all'attivazione del linfocita, ed opera altresì l'internalizzazione in endosomi dell'antigene complessato al recettore. Qualora si trattasse di un antigene proteico, questo verrebbe processato e presentato ai linfociti T (1).

Vie di trasduzione del segnale del BCR

Affinché avvenga la trasmissione di un segnale di attivazione, è necessario che due o più molecole di BCR si aggreghino grazie al legame ad un antigene multivalente (1). La trasduzione è svolta da due proteine transmembrana, chiamate Igα e Igβ, tra loro legate covalentemente da un ponte disolfuro e associate non covalentemente al BCR. Igα e Igβ hanno un ruolo importante anche nell'espressione delle Ig a livello di membrana, e i loro domini intracellulari sono dotati di regioni ITAM, essenziali per la trasduzione. Durante l'aggregazione recettoriale, numerosi motivi ITAM vengono a trovarsi tra loro adiacenti, innescando la cascata di trasduzione. Pochi minuti dopo il riconoscimento, le chinasi Lyn, Fyn e Blk, associate al complesso BCR, fosforilano i residui di tirosina delle regioni ITAM di Igα e Igβ. A tali residui fosforilati si lega, tramite i propri domini SH2, la tirosin-chinasi Syk. Per attivarsi, Syk deve essere fosforilata in uno specifico residuo di tirosina. Tale fosforilazione può avvenire a opera di Lyn, Fyn o Blk, oppure può essere Syk ad autofosforilarsi. Syk attiva una serie di altre proteine. Tra esse rientra l'isoforma γI della fosfolipasi C (PLCγI), la quale scinde il fosfatidil-inositolo (PIP2) di membrana in IP3 e DAG. L'IP3 incrementa la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} mobilizzandone le riserve intracellulari e facendolo possibilmente accedere anche dall'ambiente extracellulare. Gli elevati livelli intracellulari di Ca^{2+} inducono la traslocazione di alcune isoforme di PKC alla membrana cellulare, ove vengono attivate dal DAG e fosforilano residui di serina e treonina di alcune proteine, tra cui Ras. Così attivata, Ras innesca la cascata delle chinasi MAP. Le cascate che insorgono attivano fattori di trascrizione, tra cui Fos, JunB, NF-κB e Myc, responsabili dell'induzione di geni codificanti proteine necessarie per l'attivazione delle cellule B. I linfociti B in cui è avvenuto lo scambio isotipico godono delle stesse vie di trasduzione del segnale presenti nei linfociti B vergini esprimenti IgM e IgD come recettori, poiché la trasmissione del segnale dipende esclusivamente da Igα e Igβ (1).

Secondo segnale di attivazione dei linfociti B: il recettore del complemento CR2

L'attivazione dei linfociti B richiede un secondo segnale, che può essere conferito da proteine del sistema del complemento. Il recettore CR2 (*Complement Receptor-2*), espresso sui

linfociti B, lega C3b, un prodotto proteolitico del complemento (1). C3b lega direttamente l'antigene oppure lega complessi antigene-anticorpo, e si associa al CR2. In tal modo, C3b svolge un duplice ruolo a livello dei linfociti B. Da un lato, fornisce il segnale attraverso CR2, dall'altro, portando l'antigene in prossimità delle Ig di membrana, permette a queste di legare l'antigene. CR2 è presente sui linfociti B maturi in un complesso con le proteine di membrana CD19 e CD81, chiamato TAPA-1 o complesso co-recettoriale dei linfociti B. Al legame di CR2 a C3b, la porzione intracitosolica di CD19 viene rapidamente fosforilata dalle chinasi associate al BCR, con conseguente potenziamento delle vie di trasduzione del segnale promosse del BCR (1).

Aspetti anatomici e istologici dell'attivazione dei linfociti B

Le vie di segnalazione avviate a seguito dell'aggregazione delle Ig di membrana scatenano una serie di eventi cellulari importanti per la proliferazione e la differenziazione del linfocita B (1). La cellula entra in fase G1 del ciclo cellulare e incrementa il suo volume, il suo contenuto citoplasmatico di mRNA e di organelli di cui i ribosomi. Nell'ambito del ruolo dei linfociti B come APC professionali, si ha l'aumento dell'espressione di molecole MHC di classe II, e di molecole costimolatorie, di cui prima CD86, poi CD80. Aumenta anche l'espressione di recettori per citochine prodotte da linfociti T, quali IL-2 e IL-4. Si attivano inoltre geni anti-apoptotici i cui prodotti prolungano la sopravvivenza cellulare. Molti antigeni timo-indipendenti sono multivalenti. Tipici esempi sono i polisaccaridi e i glicolipidi, che riportano molteplici copie dello stesso epitopo nella loro struttura e sono pertanto in grado di produrre una massiva aggregazione del BCR, innescando la risposta delle cellule B senza necessità di stimolazione da parte dei linfociti T, che peraltro riconoscono solo antigeni proteici. Conversamente, gli antigeni timo-dipendenti contengono spesso solo una copia dello stesso epitopo, e non producono autonomamente aggregazione di Ig di membrana; un'interazione efficace con il BCR potrebbe tuttavia instaurarsi qualora tali antigeni formassero complessi con anticorpi secreti o proteine complementari. In ogni caso, agli antigeni proteici rispondono sempre le cellule T *helper*, che supportano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B mediante la secrezione di citochine. Per tali ragioni, nel caso di antigeni timo-dipendenti, l'attivazione dei linfociti B non richiede necessariamente una trasduzione del segnale di BCR: è di fatto sufficiente che l'antigene venga internalizzato, processato, e presentato ai linfociti T *helper*, con un'attivazione delle cellule B che avviene in conseguenza della loro attività di APC professionali. La risposta anticorpale agli antigeni proteici presuppone il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T *helper*, la presentazione dell'antigene alle cellule T *helper* effettrici da parte delle cellule B, l'attivazione dei linfociti T con espressione di molecole costimolatorie e secrezione di citochine, e la conseguente attivazione delle cellule B, le quali vanno incontro ad espansione clonale, scambio isotipico, maturazione dell'affinità, e differenziazione in linfociti B della memoria. Il processo di iniziazione della risposta anticorpale agli antigeni proteici riconosce una certa segregazione anatomica delle sue varie fasi all'interno degli organi linfoidi secondari. I linfociti T $CD4^+$ vergini riconoscono l'antigene a livello delle aree T 1-2 giorni dopo il suo ingresso, mediante presentazione da parte di cellule dendritiche e macrofagi. I linfociti B effettuano il riconoscimento a livello dei follicoli, e migrano verso aree T. Le cellule B e T che hanno incontrato lo stesso antigene si incontrano nella zona di confine tra le due aree. I linfociti T *helper* attivati secernono citochine ed esprimono molecole importanti per la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B (1).

Ruolo dei linfociti B come APC professionali

I linfociti B legano l'antigene peptidico grazie al BCR, lo internalizzano in vescicole endosomiali, lo processano e ne presentano i frammenti peptidici attraverso molecole MHC di classe II (1). In un complesso aptene-carrier, la porzione riconosciuta dall'anticorpo di membrana del linfocita T è l'aptene, mentre i linfociti T riconoscono epitopi del carrier tramite i peptidi presentati dalle cellule B, che internalizzano il complesso aptene-carrier. Un fenomeno analogo si manifesta con gli antigeni proteici: le Ig di membrana legano un determinante della proteina, mentre i linfociti T specifici per lo stesso antigene ne riconoscono altri. Al riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti B consegue un aumento dell'espressione di molecole costimolatorie, tra cui CD86 e CD80, che avviene contestualmente alla processazione dell'antigene. In risposta alla costimolazione di tali molecole, i linfociti T *helper* attivati dall'antigene, una volta legati i complessi MHC II espressi sulle cellule B, esprimono sulla propria superficie CD40L. Quest'ultimo lega CD40, molecola presente costitutivamente sui linfociti B. In questo modo, unità di CD40 oligomerizzano, reclutando a livello della porzione intracellulare di CD40 proteine TRAF (*TNF Receptor-Associated Factors).* Tali proteine avviano una cascata di segnalazione che culmina nell'attivazione di diversi fattori di trascrizione, tra cui NF-κB e AP-1. Uno degli effetti della via CD40-CD40L è l'ulteriore aumento dell'espressione di molecole B7. Un'espressione considerevole di B7 sui linfociti B e l'espressione di CD40L sui linfociti T si verificano solo in caso di stimolazione da parte dell'antigene nei confronti di questi due tipi cellulari. Ciò garantisce che le interazioni fra linfociti B e T coinvolgano solo cellule specificamente sollecitate (1).

Ruolo delle citochine nella risposta dei linfociti B

Le citochine secrete dai linfociti T *helper* attivati, agendo sinergisticamente con la via di CD40, favoriscono la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B (1). Esse condizionano anche la risposta anticorpale: lo spettro di citochine influenza profondamente lo scambio isotipico verso le varie classi anticorpali. In tal senso, le citochine svolgono ruoli diversi tra loro, anche se gli effetti di molte citochine possono parzialmente sovrapporsi. Può sussistere sinergismo o antagonismo fra citochine. Il riconoscimento antigenico da parte dei linfociti B induce l'espressione dei recettori delle citochine. I linfociti B che interagiscono con le cellule T *helper* sono quelli fisicamente esposti alle concentrazioni di citochine più elevate. Anche un linfocita B non specifico che si trovasse casualmente nelle adiacenze del linfocita T *helper* secernente non si troverebbe investito da così alti livelli citochinici. Tra le citochine, l'IL-2, l'IL-4 e l'IL-5, prodotte da linfociti T *helper*, agiscono sinergicamente come fattori di crescita per le cellule B, L'IL-6, secreta da molte cellule tra cui macrofagi e linfociti T, stimola la proliferazione di linfociti B già differenziati e secernenti anticorpi (1).

Cellule secernenti anticorpi

Avvenuta la proliferazione dei linfociti B che hanno riconosciuto l'antigene, una parte di essi si differenzia in cellule secernenti anticorpi (1). Tale differenziazione richiede una modificazione dell'espressione delle Ig dalla forma di membrana a quella secreta. Il dominio transmembrana e la porzione intracellulare di un anticorpo di membrana sono codificati da due distinti esoni nel gene della catena pesante. In un linfocita B secernente anticorpi si verifica uno *splicing*

alternativo dell'mRNA primario tale da escludere tali esoni nel trascritto maturo. Tale *splicing* alternativo è indotto dal riconoscimento dell'antigene e dal traffico di segnali dipendenti dai linfociti T *helper*. In assenza del dominio transmembrana e della porzione intracellulare, l'anticorpo non possiede i caratteri biochimici per potersi ancorare alla membrana, ed è dunque destinato ad essere secreto. Tutte le catene pesanti possono essere sintetizzate sia nella forma di membrana che in quella secreta, con l'eccezione della catena δ, prodotta raramente in forma secreta. Ne consegue per le IgD un ruolo quasi esclusivo di anticorpi di membrana. Con il procedere della differenziazione, le quantità di mRNA codificante la forma secreta divengono sempre più elevate. La produzione anticorpale è regolata dagli stessi segnali che regolano la proliferazione delle cellule B, ossia CD40 e le citochine. Questi segnali attivano fattori che aumentano il tasso di trascrizione dei geni delle Ig. Molte citochine, tra cui l'IL-2, l'IL-4 e l'IL-6 aumentano la sintesi e la secrezione di anticorpi in cellule B attivate. Le citochine dirottano inoltre il macchinario di *splicing* verso la formazione del trascritto per la sintesi di Ig secretorie. Negli organi linfoidi, le cellule secernenti anticorpi si collocano in sedi extrafollicolari, come nella zona midollare dei linfonodi e nella polpa rossa della milza. Tali cellule migrano anche nel midollo osseo, in una tal misura che dopo 2-3 settimane dall'inizio della risposta immunitaria il midollo osseo è la sorgente principale di anticorpi specifici. Molte cellule B secernenti anticorpi vanno incontro a differenziazione in plasmacellule, caratterizzate dalla massiccia produzione anticorpale. Le cellule producenti anticorpi sono tuttavia stanziali; sono gli anticorpi che esse rilasciano che, diffondendosi nel plasma e nei fluidi interstiziali, possono legarsi all'antigene e innescare le funzioni effettrici della risposta umorale (1).

Scambio isotipico

I linfociti B maturi esprimono in superficie sia IgM che IgD (131). In queste cellule, il segmento VDJ riarrangiato è trascritto assieme ai due locus C_H ad esso contigui, ossia Cμ e Cδ. Lo *splicing* alternativo del trascritto genera due distinti mRNA maturi, ossia VDJ-Cδ e VDJ-Cμ, nella stessa cellula. Questi vengono entrambi tradotti, spiegando la coesistenza dei due isotipi (131). In risposta al legame di CD40 al suo ligando e alle citochine, una parte delle cellule B proliferate in seguito ad attivazione, esprimenti inizialmente IgM e IgD, va incontro ad uno scambio dell'isotipo della catena pesante, iniziando a produrre un'altra classe di anticorpi (1). Lo scambio isotipico avviene a livello dei follicoli degli organi linfoidi quali la milza e i linfonodi, contemporaneamente alla differenziazione delle cellule B. I segnali trasmessi da CD40 hanno un ruolo vincolante nel determinare lo scambio isotipico; in assenza di essi, si potrebbero avere solo IgM come anticorpi secreti. Il profilo citochinico è responsabile dell'orientamento delle cellule B verso le varie classi anticorpali. Invero, ogni citochina dirige lo scambio verso un certo isotipo, ma non verso altri. Tale fenomeno ha importanti implicazioni fisiopatologiche, poiché diversi agenti infettivi inducono la proliferazione di differenti sottopopolazioni di linfociti T *helper*, che a loro volta producono una distinta gamma di citochine. Lo scambio isotipico è quindi legato all'agente patogeno, e dalla classe anticorpale che viene prodotta scaturiscono funzioni effettrici volte all'eliminazione del microrganismo. Ad esempio, l'IL-4 promuove lo scambio verso le IgE, anticorpi con una funzione centrale nella risposta a infestazioni parassitarie che si legano a recettori di superficie di eosinofili e macrofagi. Dal punto di vista genetico, lo scambio isotipico è attuato mediante un processo di ricombinazione genica (1). Esso implica che il segmento VDJ venga collegato ad un gene C_H situato più a valle rispetto a quello con cui era inizialmente combinato, con l'escissione del tratto di DNA interposto (1,131). Tale ricombinazione richiede la partecipazione delle regioni di scambio (S), situate in

posizione 5' rispetto ad ogni locus C_H, ad eccezione di Cδ. Tali regioni si estendono per 1-10 kilobasi, e contengono alcune sequenze ripetute altamente conservate. L'enzima AID, specifico dei linfociti B, catalizza la conversione della citosina a uracile a livello di un singolo filamento della regione Sμ. Tale mutazione è riconosciuta come danno al DNA, e innesca la via BER (*Base Excision Repair*) o la via MMR (*MisMatch Repair*). Nei linfociti B attivati, la riparazione delle unità di uracile porta dapprima a rotture di un singolo filamento, poi a rotture del doppio filamento. I segnali derivanti da CD40 e dalle citochine inducono inizialmente una trascrizione di tipo germinativo a partire dalla regione di scambio di un determinato locus C_H. Tale trascrizione potenzia l'accessibilità a quel gene dell'enzima AID, il quale catalizza anche a livello di tale locus un danno al DNA della regione S che degenera fino alla rottura del doppio filamento a livello della regione S di tale locus C_H. A tal punto, essendovi ben due rotture del doppio filamento, il moncone di DNA a monte della regione Sμ viene saldato a quello a valle della regione S del locus C_H soggetto a trascrizione, con l'esclusione della porzione compresa tra la regione Sμ e quella relativa all'altro gene C_H. Tale processo avviene nell'ambito di una giunzione terminale non omologa classica (c-NHEJ), che in molti mammiferi è catalizzata dalle proteine Ku 70, Ku80, XRCC4 e DNA ligasi IV. Il segmento VDJ viene quindi ricombinato con il gene C_H trascrizionalmente attivo (1,131).

Risposta del centro germinativo

Poco tempo dopo l'inizio della risposta delle cellule B, che avviene al confine tra i follicoli e le aree T all'interno degli organi linfoidi, alcuni linfociti B attivati si approfondano nel follicolo (1). In tale sede, la loro intensa proliferazione origina un centro germinativo, ossia una formazione centrale che appare più chiara della porzione follicolare circostante all'esame istologico. I linfociti B attivamente proliferanti del centro germinativo, chiamati centroblasti, hanno un tempo di raddoppiamento di 6-12 ore. Nel centro germinativo si trovano anche linfociti B di più piccole dimensioni, i centrociti, cellule non proliferanti derivate dai centroblasti e destinate ai processi di differenziazione. Ogni centro germinativo è composto da uno o da pochi cloni linfocitari B. L'impalcatura strutturale e funzionale del follicolo è costituita dalle cellule follicolari dendritiche. Queste esprimono recettori per il complemento (CR1, CR2 e CR3), recettori Fc per la porzione cristallizzabile degli anticorpi, e CD40, coinvolti nella stimolazione delle cellule B del centro germinativo. Al contrario delle cellule dendritiche, le cellule follicolari dendritiche non derivano dal midollo osseo, né esprimono molecole MHC di classe II (1). Le cellule follicolari dendritiche derivano da precursori mesenchimali, stromali e localmente residenti (132). I loro lunghi prolungamenti citoplasmatici si arrangiano in un reticolo che sostiene le cellule linfoidi del follicolo (1). Le cellule B attivamente proliferanti si concentrano in una zona basale dall'aspetto più scuro all'analisi istologica, in cui le cellule follicolari dendritiche sono scarsamente rappresentate. I centrociti migrano in una zona basale adiacente ricca di cellule follicolari dendritiche, che si presenta più chiara nei preparati istologici. La formazione di centri germinativi dipende strettamente dall'attività delle cellule T *helper* e dall'interazione tra questi e i linfociti B, in particolare attraverso la via CD40-CD40L. Un centro germinativo può generarsi solo nel caso di una risposta delle cellule B ad antigeni timo-dipendenti (1).

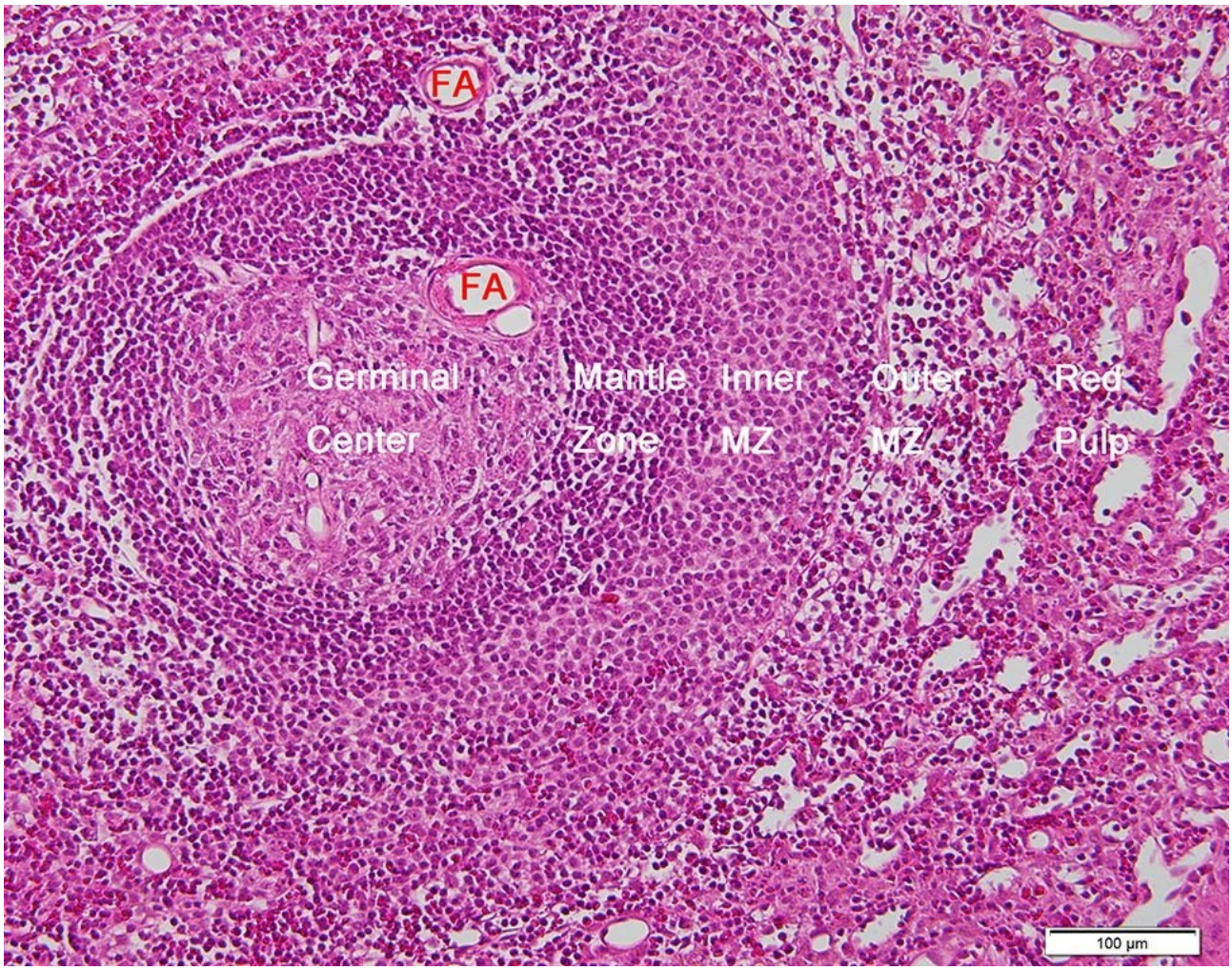

Figura 18. Centro germinativo (133)**.** Preparato istologico di milza umana in cui si rilevano un follicolo, la zona marginale interna e quella esterna. Il follicolo presenta un prominente centro germinativo, all'interno del quale si distinguono vagamente un'area più chiara e un'altra più scura. Il centro germinativo è a sua volta racchiuso nella zona mantellare del follicolo, più intensamente colorata rispetto al centro germinativo. Gli spazi contrassegnati con FA corrispondono al lume delle arteriole follicolari, viste in sezione trasversale.

Maturazione dell'affinità e ipermutazione somatica

La maturazione dell'affinità è l'aumento dell'affinità per l'antigene degli anticorpi prodotti durante la risposta umorale ad un antigene timo-dipendente (1). Essa è la conseguenza di mutazioni somatiche a livello dei geni delle Ig, cui segue la selezione e la sopravvivenza dei linfociti B secernenti gli anticorpi a maggiore affinità. Le cellule B proliferanti nei centri germinativi presentano un elevato tasso di mutazioni a carico dei geni delle catene pesanti e leggere degli anticorpi, che ammonta a una mutazione su 1000 paia di basi del gene V ad ogni divisione cellulare. Essendo tale tasso ben più alto di quello degli altri geni dei mammiferi, a questo fenomeno è valso il nome di ipermutazione somatica (1). L'enzima AID ha un ruolo fondamentale nell'ipermutazione somatica, introducendo mutazioni puntiformi per conversione della citosina in uracile a livello di IgV (131). Per la maturazione dell'affinità sono necessari il contributo dei linfociti T helper e l'interazione CD40-CD40L (1). La piena casualità delle mutazioni a carico delle cellule B del centro germinativo permette di originare sia mutazioni che incrementano l'affinità dell'anticorpo, sia altre con un effetto deleterio di riduzione dell'affinità. La selezione dei centrociti con l'affinità più elevata è operata dalle cellule

follicolari dendritiche. Queste espongono in superficie molecole di antigene tramite i recettori del complemento, che legano i prodotti C3b e C3d complessati all'antigene, e i recettori Fc, che si associano al frammento cristallizzabile degli anticorpi a loro volta legati all'antigene. Gli antigeni sono presenti nel centro germinativo anche in forma solubile. I linfociti B in grado di legarsi con alta affinità all'antigene sopravvivono grazie ai segnali trasmessi dal BCR, che inducono proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl. I centrociti che, a causa dell'ipermutazione somatica, acquisiscono mutazioni riducenti l'affinità non legano l'antigene, quindi non vengono stimolati dalle cellule follicolari dendritiche e vanno incontro ad apoptosi. Con lo sviluppo della risposta anticorpale, l'antigene viene progressivamente depletato, con una sua diminuzione anche all'interno del centro germinativo. Questo calo di concentrazione genera pressioni di selezione sempre maggiori sullo sviluppo linfocitario nel centro germinativo, con la produzione di anticorpi ad affinità sempre più elevata. In presenza di livelli di antigene sempre più bassi, solo i centrociti con un'affinità anticorpale molto più alta di quella della prima risposta umorale riescono a legare l'antigene sulle cellule follicolari dendritiche. I linfociti B che, con il fenomeno dell'ipermutazione somatica, non acquisiscono un'adeguata affinità anticorpale in tali condizioni non riescono a complessarlo, e subiscono il destino apoptotico. Le mutazioni non favorevoli sono responsabili degli intensi fenomeni di morte apoptotica che si osservano istologicamente nei centri germinativi. Alcuni linfociti B sopravvissuti ai processi di selezione migrano dalla zona basale a quella apicale del centro germinativo, ove possono nuovamente manifestare uno scambio isotipico. Le cellule poi evadono dal centro germinativo e si differenziano in cellule secernenti anticorpi o in plasmacellule. Tali cellule possono collocarsi nel midollo osseo, ove la loro secrezione anticorpale può proseguire per anni (1).

Linfociti B della memoria

A seguito dell'attivazione, alcuni dei linfociti B non si differenziano in cellule secernenti anticorpi, ma divengono cellule B della memoria, capaci di sopravvivere per lungo tempo anche in assenza di stimolazione antigenica (1). In caso di una nuova esposizione allo stesso antigene, tali cellule, altrimenti in uno stato di quiescenza funzionale, generano una rapida risposta umorale. Le cellule B della memoria possono permanere nei linfonodi oppure ricircolare nel sangue e stabilirsi in altri tessuti linfoidi. Il loro BCR è altamente affine all'antigene come risultato dell'ipermutazione somatica, ed è di una classe diversa dalle IgM a causa dello scambio isotipico. Alla riesposizione all'antigene si ha una risposta anticorpale molto più repentina di quella che si verifica alla prima esposizione, caratterizzata da anticorpi ad elevata affinità e di isotipo diverso dalle IgM, Questa scaturisce dall'attivazione dei linfociti B della memoria nel centro germinativo e da un veloce accumulo di immunocomplessi sulla superficie delle cellule follicolari dendritiche (1).

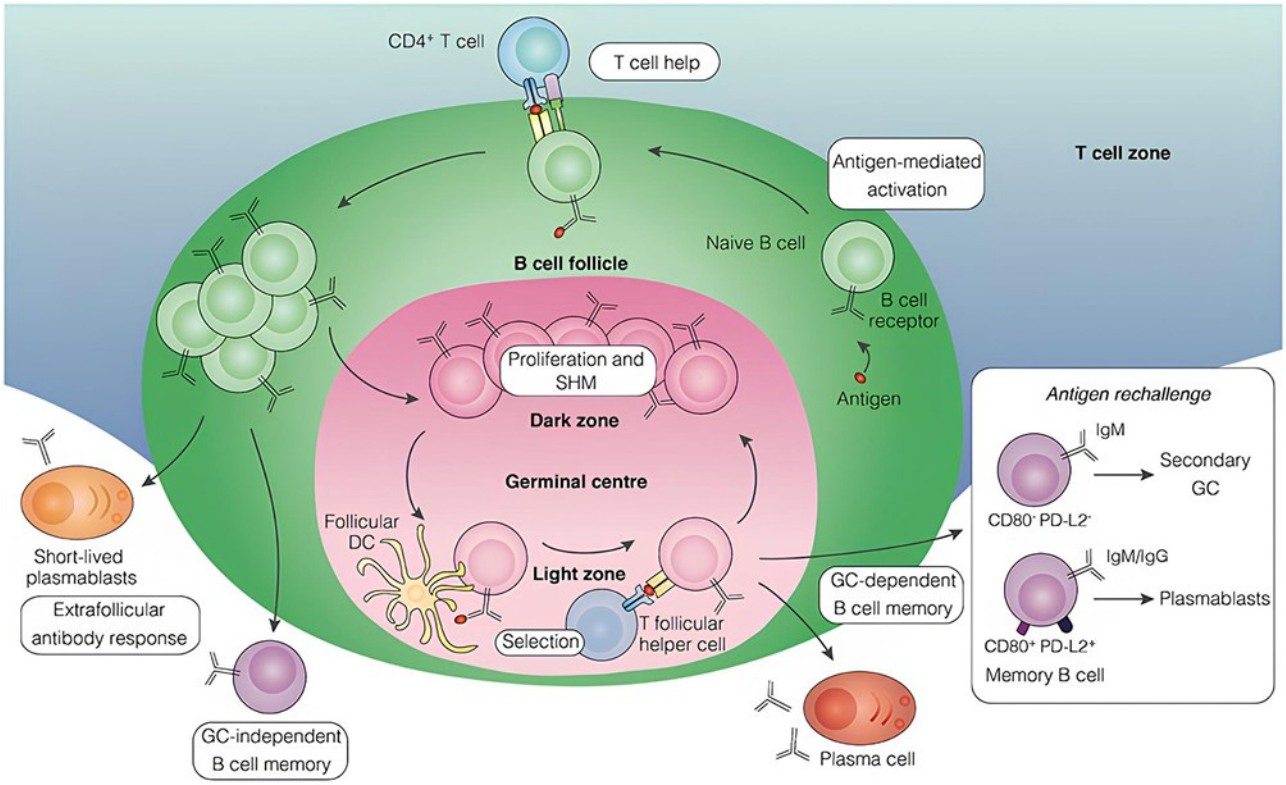

Figura 19. Risposte anticorpali ad antigeni timo-dipendenti negli organi linfoidi secondari (134)**.** Si osservino l'iniziale contatto del linfocita B con l'antigene e la successiva interazione della cellula B con il linfocita T specifico per lo stesso antigene al confine tra il follicolo e l'area T. Alcuni linfociti B generano plasmablasti a breve emivita e cellule della memoria, mentre altri instaurano la reazione del centro germinativo, con ipermutazione somatica e la generazione di plasmacellule a lunga emivita.

Risposte anticorpali agli antigeni timo-indipendenti

Le risposte anticorpali ad antigeni timo-indipendenti mostrano alcune sostanziali differenze rispetto a quelle agli antigeni timo-dipendenti (1). Queste ultime presuppongono l'intervento dei linfociti T helper nel corso della risposta primaria all'antigene. I fenomeni di scambio isotipico e di maturazione dell'affinità sono infatti dovuti alle cellule T *helper* e ai segnali che essi generano grazie a costimolatori e citochine. Gli antigeni timo-indipendenti generano una risposta umorale senza ausilio dei linfociti T *helper*. Gli anticorpi che ne risultano tendono ad avere bassa affinità e si tratta in genere prevalentemente di IgM, con limitati fenomeni di scambio isotipico verso altre classi (1). Gli antigeni timo-indipendenti sono distinti in TI-I, come il lipopolisaccaride (LPS), che si legano al BCR e al contempo ai TLRs, e TI-II, come i polisaccaridi, che inducono massiva aggregazione di BCR in virtù delle loro unità molecolari ripetute e reclutano inoltre PRRs (135). A dosi molto più elevate di quelle necessarie per elicitare una risposta anticorpale, gli antigeni TI-1 si comportano da attivatori policlonali di linfociti B agendo sui TLRs, i quali hanno un'affinità e una specificità per gli antigeni molto minori rispetto al BCR (136). Le popolazioni linfocitarie che rispondono agli antigeni timo-indipendenti sono le cellule B1 e le cellule B della zona marginale della milza (135,137). Le cellule B1 sono i linfociti B più rappresentati a livello peritoneale, e risiedono, seppur in quantità molto minore, anche nella milza (137). I linfociti B1 sono suddivisi nelle sottopopolazioni B1a ($CD5^+$) e B1b ($CD5^-$) sulla base dell'espressione del recettore CD5 (137). I dati sperimentali derivanti dalla somministrazione di antigeni timo-indipendenti

dimostrano che entrambe le sottopopolazioni sono in grado di differenziarsi in cellule B della memoria a lunga emivita (138–140). Nel topo, le cellule B della zona marginale sono esclusivamente situate nella zona marginale della milza (137). Nell'uomo si collocano anche nella parete interna del seno sottocapsulare dei linfonodi, nell'epitelio delle cripte tonsillari e nella regione sottoepiteliale a cupola delle placche di Peyer (141–144). Nel topo, gli antigeni timo-indipendenti accedono alla zona marginale splenica attraverso i seni marginali e vengono captati da popolazioni di macrofagi che si distinguono in macrofagi metallofili e macrofagi della zona marginale (135). Tali macrofagi captano gli antigeni tramite PRRs e li presentano alle cellule B della zona marginale (135,145–147), le quali li riconoscono attraverso il BCR e i TLRs (148). Gli antigeni circolanti possono essere presentati anche da cellule dendritiche e neutrofili (149,150). Nella zona marginale umana mancano i due stipiti macrofagici descritti per il topo, ma vi sono dispersi macrofagi aspecifici, pari a quelli della polpa rossa (135). Si ritiene che i neutrofili, le cellule dendritiche, e le cellule littorali, ossia cellule endoteliali dei seni venosi, ricoprano un ruolo importante nella captazione di antigeni timo-indipendenti nell'uomo (135,149,151,152). In risposta a questi antigeni, le cellule B della zona marginale si differenziano in plasmablasti producenti elevate quantità di IgM (153). Possono verificarsi fenomeni di scambio isotipico verso IgG e IgA e, nell'uomo, anche ipermutazione somatica (135). I fenomeni di attivazione, proliferazione, risposta anticorpale, scambio isotipico ed ipermutazione somatica delle cellule della zona marginale sono indotti da citochine e ligandi prodotti dalle cellule che captano l'antigene. Le cellule B della zona marginale sviluppano anche risposte ad antigeni timo-dipendenti, con la formazione del centro germinativo e la comparsa di plasmacellule secernenti IgG e di cellule della memoria (135).

Feedback anticorpale

Gli anticorpi IgG formano complessi con l'antigene che inibiscono l'attivazione dei linfociti B mediante un meccanismo a feedback negativo. La porzione cristallizzabile delle IgG di tali complessi si lega al recettore FcγRIIB, appartenente alla famiglia CD32 (1). FcγRIIB esiste nelle due isoforme FcγRIIB1 e FcγRIIB2, derivanti da *splicing* alternativo (154). FcγRIIB1 è altamente espresso sui linfociti B e, in minor regime, sui monociti. FcγRIIB2 è espresso ad alti livelli sui basofili, in bassa quantità sui monociti (154,155). Recettori FcγRIIB sono presenti anche sul muscolo liscio delle vie aeree e sulle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici (156,157). La porzione intracitoplasmatica di entrambe le isoforme di FcγRIIB contiene un motivo di sei amminoacidi che media la trasduzione di un segnale negativo (1). Tale sequenza, presente anche in altri recettori del sistema immunitario, prende il nome di ITIM. ITIM contiene un residuo di tirosina che subisce fosforilazione quando CD32 viene occupato. Si forma così un sito di aggancio per la protein-tirosin-fosfatasi SHP-1 e per l'inositolo-5-fosfatasi SHIP. SHIP idrolizza il PIP3 generato dall'aggregazione delle Ig di membrana, con conseguente arresto della risposta delle cellule B. L'antigene interagisce sia con il BCR, sia con CD32 attraverso l'IgG di secrezione a cui si lega, portando dunque CD32 in stretta prossimità dell'Ig di membrana. In tal modo, le fosfatasi associate a CD32 possono espletare la loro funzione inibitoria a carico della trasduzione del segnale di BCR. Grazie al feedback anticorpale, la risposta umorale viene modulata al fine di evitare un'eccessiva secrezione anticorpale. Allo stesso tempo, tuttavia, gli anticorpi esercitano anche una regolazione positiva della propria produzione. Ciò avviene poiché gli anticorpi attivano la cascata del complemento, e C3d conferisce, mediante il recettore CR2, un secondo segnale per l'attivazione dei linfociti B (1).

RICIRCOLAZIONE DEI LINFOCITI

Per ricircolazione si intende un processo continuo di trasferimento dei linfociti tra il sistema linfoide, il sangue e i tessuti non linfoidi (1). L'extravasazione, ossia il passaggio dal sangue ai tessuti mediante trasmigrazione attraverso le pareti vasali, è compiuta da tutti i leucociti. La ricircolazione è invece appannaggio esclusivo dei linfociti. I fenomeni di ricircolazione detengono un ruolo vitale nell'espletamento delle funzioni immunitarie. Il numero di linfociti specifici per un dato antigene è molto basso, ed è dunque proprio pattugliando incessantemente gli organi linfoidi secondari che i linfociti raggiungono una realistica probabilità di incontrare l'antigene per cui sono specifici. La ricircolazione dei linfociti è governata da molecole di adesione espresse sull'endotelio e sulle stesse cellule linfoidi. Prima di approfondire i meccanismi di ricircolazione, è opportuno anticipare che le cellule vergini manifestano un profilo di ricircolazione ben distinto da quello dei linfociti effettori e della memoria (1).

Basi istologiche e biochimiche della localizzazione dei linfociti

La localizzazione dei linfociti in un tessuto è condizionata dall'adesione degli stessi all'endotelio e alla matrice connettivale extracellulare (1). Tali interazioni si stabiliscono grazie al legame tra le molecole di adesione espresse dai linfociti e i loro rispettivi ligandi presenti sulle cellule endoteliali delle venule post-capillari e nella matrice extracellulare. L'associazione dei linfociti alla matrice extracellulare e il loro susseguente distacco dalla stessa influiscono sui tempi di permanenza delle cellule linfoidi in quel distretto anatomico. Le molecole coinvolte nelle interazioni che regolano la ricircolazione sono ascrivibili alle famiglie delle selectine e delle integrine e alla superfamiglia delle Ig. L'antigene non esplica un ruolo diretto nella ricircolazione e nel reclutamento dei linfociti nei focolai infiammatori, tuttavia la stimolazione antigenica accresce l'affinità delle integrine per i relativi ligandi, condizionando di fatto la permanenza dei linfociti nel sito anatomico in cui essi hanno riconosciuto l'antigene. Le molecole espresse sull'endotelio prendono il nome di addressine, dall'inglese "*to address*", ossia "indirizzare", dato che indirizzano la migrazione linfocitaria in un determinato distretto (1).

Ricircolazione dei linfociti vergini

Grazie alle loro dinamiche di ricircolazione, i linfociti T vergini si localizzano principalmente negli organi linfoidi secondari, ove sussiste la maggiore probabilità che essi riescano ad incontrare per la prima volta l'antigene (1). Per guadagnare l'accesso al parenchima dei linfonodi, le cellule T vergini che circolano nel sangue devono attraversare la parete delle già menzionate venule ad entotelio alto (HEVs, *High Endothelium Venules*), particolari venule post-capillari così chiamate per il loro endotelio che, in confronto a quello dotato di cellule piatte che si riscontra in tutti gli altri distretti anatomici, si presenta nettamente più rilevato, e le cellule che lo costituiscono appaiono cuboidali all'esame istologico. Le venule ad endotelio alto sono una caratteristica distintiva di tutti gli organi linfoidi secondari, ad eccezione della milza, ove esse sono assenti. Le venule ad endotelio alto esprimono addressine che si legano ai rispettivi ligandi sui linfociti. Ne consegue che, quando i linfociti vengono in contatto con le cellule endoteliali di tali venule, essi non rimbalzano come avviene a livello di altri siti

anatomici, ma vi aderiscono per diversi secondi. Tale interazione è a bassa affinità, quindi il flusso sanguigno riesce a propellere, seppur lentamente, i linfociti sulla superficie dell'endotelio in un fenomeno chiamato rotolamento. In questa fase, alcuni linfociti accrescono la forza della loro adesione all'endotelio andando incontro ad un arresto. Interrotto il rotolamento, questi si appiattiscono e iniziano a farsi strada tra le cellule endoteliali, dando corso alla propria trasmigrazione attraverso la parete venulare finalizzata all'ingresso nel linfonodo. Le HEVs sono anche caratterizzate da connessioni intercellulari che facilitano l'extravasazione dei linfociti. Da un punto di vista strettamente molecolare, il processo appena esposto è dovuto all'intervento sequenziale di diverse molecole (1). La principale molecola di adesione espressa dai linfociti è la L-selectina (1), i cui ligandi endoteliali sono rappresentati da molteplici glicoproteine solfate, sialilate e fucosilate, comprendenti GlyCAM-1 (*Glycan-bearing Cell Adhesion Molecule-1*) e CD34 (1,158). Tali sialomucine sono collettivamente note come PNAds (*Peripheral Node Addressins*), proprio perché espresse sulle cellule endoteliali delle venule ad endotelio alto dei linfonodi periferici (1,158). Le venule ad endotelio alto delle placche di Peyer intestinali non presentano PNAd, ma la molecola MAdCAM-1 (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1*), che funge da ligando per la L-selectina in tali organi (159). L'interazione tra la L-selectina e le molecole espresse sull'endotelio media il legame iniziale dei linfociti all'endotelio, seguito dal rotolamento. L'improvviso arresto dei linfociti è dovuto all'aumento di affinità dell'integrina LFA-1 presente sui linfociti per i suoi ligandi ICAM-1 e ICAM-2, espressi sull'endotelio. Quest'ultimo fenomeno dipende da un cambio conformazionale di LFA-1 indotto da chemochine legate all'endotelio (159). Le chemochine che partecipano alla trasmigrazione dei linfociti attraverso le HEV sono CCL21 e CXCL12 per le cellule T e B vergini, mentre i soli linfociti B vergini sono responsivi anche a CXCL13 (158). I linfociti T entrati nello stroma linfonodale possono scansionare la superficie di cellule dendritiche mature e macrofagi (1). Tali interazioni sono mediate da molecole di adesione, tra cui LFA-1 dei linfociti e il suo ligando ICAM-1, espresso sulla controparte. Nel caso di un riconoscimento specifico dell'antigene che tali cellule presentano, i linfociti T si attivano dando avvio alla fase specifica della risposta immunitaria. Con la differenziazione in cellule T effettrici e della memoria, i linfociti T subiscono profonde variazioni del profilo di ricircolazione. Qualora invece i linfociti T non venissero attivati durante la perlustrazione di un linfonodo, essi evaderebbero dallo stesso attraverso i vasi linfatici efferenti, per poi giungere nel dotto toracico, e da questo nuovamente al circolo sanguigno, per migrare in altri linfonodi (1). La fuoriuscita dei linfociti T e B dai linfonodi attraverso i vasi linfatici efferenti è dipendente dalla concentrazione di sfingosina-1-fosfato (S1P), la cui segnalazione tramite il recettore S1PR può sovrastare i segnali ritentivi mediati dalle chemochine (160). I livelli elevati di S1P presenti nel sangue e nella linfa portano all'internalizzazione del recettore da parte dei linfociti. All'interno dei tessuti, le più basse concentrazioni di S1P portano alla riespressione di S1PR (160). Un altro fattore che influenza la ritenzione linfonodale dei linfociti è il sistema nervoso ortosimpatico: la stimolazione adrenergica, mediante il recettore β2-adrenergico, contribuisce alla ritenzione delle cellule B e T nei linfonodi aumentando la responsività dei recettori per le chemochine CCR7 e CXCR4 (161). Entro breve tempo dall'esposizione ad un antigene di un determinato distretto anatomico, il flusso sanguigno ai linfonodi drenanti tale sito aumenta enormemente, cosicché un numero molto elevato di linfociti vergini può farvi accesso (1). Contestualmente, il flusso linfatico efferente da tali linfonodi si arresta (1).

Ricircolazione dei linfociti T effettori e della memoria

La ricircolazione dei linfociti T effettori e della memoria rende possibile l'espletamento della funzione immunitaria specifica in ogni singolo distretto dell'organismo, anche se le risposte adattative prendono origine nel circoscritto ambiente degli organi linfoidi periferici (1). Nel corso del processo di differenziazione, i linfociti T accrescono la propria espressione di molecole di adesione, tra cui le integrine LFA-1 e VLA-4, i cui ruoli verranno più estesamente esaminati in seguito. Nelle prime ore dopo l'attivazione si assiste anche ad un aumento dell'affinità delle integrine dei linfociti T per i relativi ligandi presenti sulle cellule dendritiche, sui macrofagi e nella matrice stromale. Dopo 24-48 ore dal riconoscimento dell'antigene, l'affinità delle integrine inizia a decrescere. Questa sequenza di eventi spiega la transitoria ritenzione linfonodale dei linfociti T che si osserva dopo il contatto con l'antigene. A due giorni di distanza dal riconoscimento antigenico, si ha una massiccia fuoriuscita di cellule T attivate dal linfonodo attraverso i vasi linfatici efferenti. Ciò accade proprio a causa della progressiva attenuazione dell'affinità delle integrine per i ligandi. I linfociti T vengono quindi convogliati al dotto toracico, dal quale si immettono nel circolo generale. I regimi di ricircolazione dei linfociti T effettori e della memoria prevedono la loro localizzazione preferenziale nei focolai di infezione e di infiammazione e nei tessuti linfoidi in cui essi si sono originariamente differenziati, con netta contrapposizione con i linfociti vergini, i quali si distribuiscono casualmente negli organi linfoidi periferici. All'altezza dei focolai infiammatori, i linfociti T effettori e della memoria trasmigrano attraverso le ampiamente distribuite venule ad endotelio piatto. I meccanismi biochimici di questo fenomeno saranno appropriatamente discussi in merito alla fase effettrice dell'immunità, ma si anticipa che le divergenze nella ricircolazione dei linfociti T effettori e della memoria rispetto a quelli vergini derivano dal profilo di molecole di adesione, ben diverso tra questi stadi differenziativi. Un esempio è dato dalla L-selectina, la cui espressione si riduce notevolmente con la differenziazione, ostacolando la trasmigrazione attraverso le venule ad endotelio alto da parte delle cellule T effettrici e della memoria. I linfociti T della memoria esibiscono maggiore propensione a migrare in determinati tessuti sulla base delle molecole di adesione che esprimono: cellule della memoria esprimenti CLA-1 (*Cutaneous Lymphocyte Antigen-1*), il cui ligando è l'E-selectina, si stanziano tipicamente nella cute (1).

Ricircolazione dei linfociti nell'apparato digerente

Uno sguardo particolare viene ora rivolto alla ricircolazione dei linfociti in ambito mucosale, con particolare riferimento al tratto gastrointestinale. La ricircolazione a livello delle mucose coinvolge due distinti compartimenti, i tessuti linfoidi associati alle mucose e la lamina propria (162). Nel tubo intestinale, i linfociti vergini accedono alle placche di Peyer per extravasazione attraverso le venule ad endotelio alto. All'incontro con l'antigene in tali organi linfoidi, le cellule vanno incontro ad espansione clonale e a differenziazione. La progenie cellulare risultante fuoriesce dalle placche di Peyer attraverso i vasi linfatici efferenti. Giunti nei linfonodi mesenterici, tali linfociti intraprendono un'ulteriore fase di maturazione. Successivamente, essi proseguono attraverso l'albero linfatico fino al dotto toracico, e si immettono quindi nel circolo sanguigno. Raggiunte le mucose del tubo digerente, i linfociti che in tali sedi erano stati inizialmente attivati possono farvi accesso per extravasazione a livello delle venule ad endotelio piatto della lamina propria. Alcune delle cellule linfoidi ivi penetrate si insinuano tra le cellule epiteliali della mucosa, andando a costituire la sottopopolazione dei linfociti

intraepiteliali. Per poter trasmigrare attraverso le venule ad endotelio alto delle placche di Peyer e le venule regolari della lamina propria della mucosa intestinale, i linfociti devono esprimere l'integrina α4β7, il cui ligando è la già menzionata MAdCAM-1 (162). L'interazione tra α4β7 e MAdCAM-1 media sia l'adesione iniziale del linfocita all'endotelio, sia l'arresto successivo al rotolamento (163). Nelle venule ad endotelio alto, MAdCAM-1 può trovarsi in forma modificata con residui carboidratici propri delle PNAds (164). Pertanto, MAdCAM-1 è anche ligando della L-selectina nelle venule ad endotelio alto delle placche di Peyer e dei linfonodi mesenterici (164). La L-selectina e α4β7 sono ambedue importanti per la migrazione dei linfociti nei linfonodi mesenterici e nelle placche di Peyer (165). Invero, topi *knockout* per entrambe le molecole mostrano effetti molto più severi sulla capacità dei linfociti di trasmigrare attraverso le venule ad endotelio alto di questi organi e sulla riduzione del numero di linfociti nelle placche di Peyer e nei linfonodi mesenterici rispetto ai topi *knockout* per una sola di queste proteine (165). Tra i recettori per le chemochine, CCR9 sembra avere un ruolo specifico nella migrazione dei linfociti nelle mucose (166). Topi *knockout* per tale recettore sono caratterizzati da una forte diminuzione del numero dei linfociti intraepiteliali TCRγδ$^+$ nella mucosa intestinale, con un parallelo aumento degli stessi linfociti TCRγδ$^+$ nella milza e nei linfonodi, rispetto agli animali *wild-type* (166). Inoltre, topi con deficit di CCR9 non generano una efficiente risposta anticorpale mucosale, ossia costituita da IgA, contro antigeni timo-dipendenti somministrati per via orale (167). Tale riscontro è correlato alla riduzione del numero di plasmacellule secernenti IgA nella lamina propria della mucosa intestinale rispetto ai topi *wild-type*, a sua volta legata alla compromessa migrazione delle plasmacellule a livello intestinale. Ciononostante, l'architettura e la composizione cellulare delle placche di Peyer e dei linfonodi mesenteriali non risultano alterate dal deficit di CCR9 (167). La chemochina CCL25, ligando di CCR9, è espressa nella mucosa dell'intestino tenue, ove media il reclutamento organo-specifico dei linfociti, ma non in quella del colon (168). In uno studio in microscopia intravitale sul topo, il blocco del recettore CCR9 ha significativamente inibito l'accumulo nella mucosa intestinale di linfociti della lamina propria e di linfociti intraepiteliali somministrati per via endovenosa. Tale inibizione non è stata evidenziata nel colon. I linfociti a fenotipo CCR9$^+$ migrano quindi preferibilmente nella mucosa dell'intestino tenue (168). La chemochina CCL28, ligando del recettore CCR10, è espressa invece da un più ampio insieme di mucose, tra cui quelle dello stomaco e dell'intestino crasso (169). Una buona parte delle cellule secernenti IgA presenta CCR10. Mediante segnalazione attraverso CCR10, CCL28 media la localizzazione di questi linfociti B in tutti i distretti mucosi in cui essa è prodotta, compreso il colon, indipendentemente dalla sede anatomica in cui tali cellule sono state attivate (169). L'asse CCR7-CCL19/CCL21, di cui si era già accennato, riveste una grande importanza nel reclutamento linfocitario nelle placche di Peyer (170). CCR7 e CXCR4 permettono l'adesione dei linfociti T e B alle venule ad endotelio alto delle placche di Peyer, ove le chemochine CCL19, CCL21 e CXCL12 sono abbondantemente presenti sull'endotelio. Solo a livello dei follicoli delle placche di Peyer, le venule ad endotelio alto espongono in superficie CXCL13, la quale stimola l'adesione dei linfociti B tramite il loro recettore CXCR5 (170). Al loro ingresso nella mucosa dell'intestino tenue, i linfociti T intraepiteliali CD8$^+$ accrescono la propria espressione della molecola CD103, il cui ligando è l'E-caderina presente sull'epitelio (171). La chemochina CCL25 potenzia l'adesione mediata da CD103 dei linfociti intraepiteliali alla mucosa (171).

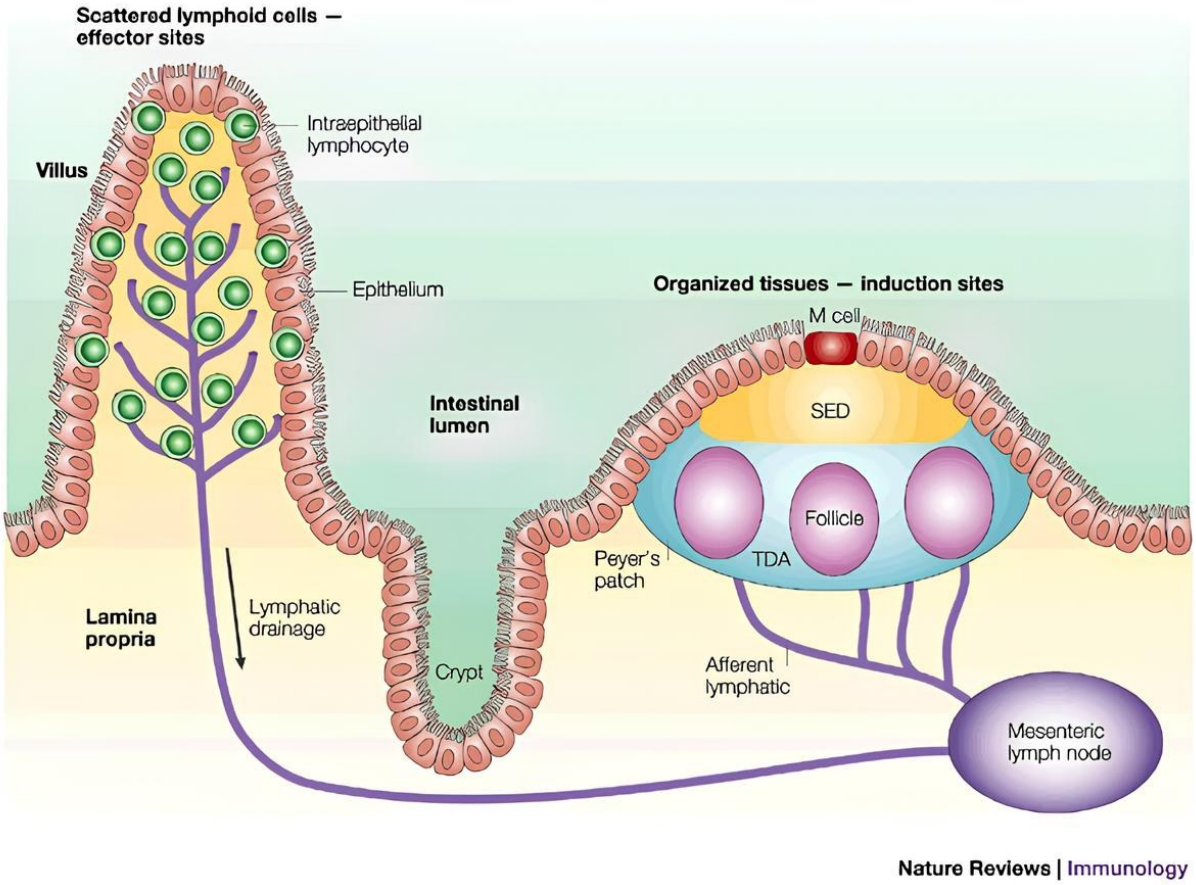

Figura 20. Ricircolazione dei linfociti nell'intestino tenue (172)**.** Dopo l'iniziale attivazione nei siti induttivi, in questo caso la placca di Peyer raffigurata, i linfociti migrano ai linfonodi mesenterici. Ritornati al tubo digerente tramite il circolo sistemico, i linfociti popolano in maniera dispersa i siti effettori, ossia la lamina propria e, nel caso dei linfociti intraepiteliali, la mucosa.

Ricircolazione dei linfociti nella milza

Ben più enigmatici e controversi sono i meccanismi di localizzazione dei linfociti nella milza. Tale spinoso problema trae origine dall'assenza delle venule ad endotelio alto e di strutture ad esse equiparabili nella milza (173). MAdCAM-1 è espressa sulle cellule di rivestimento del seno marginale (174). MAdCAM-1 non è però coinvolta nell'adesione e nella trasmigrazione dei linfociti nella milza; la forma splenica di questa molecola non risulta essere modificata con i residui carboidratici propri delle PNAds, al contrario di ciò che avviene nei linfonodi mesenterici e nelle placche di Peyer (174). Innumerevoli studi condotti nella seconda metà del XX^ secolo hanno attribuito alla zona marginale e al seno marginale un ruolo di sito di extravasazione delle cellule linfoidi nella milza (175–180). In particolare, nel 1973 sono stati identificati canali di attraversamento della zona marginale (*marginal zone bridging channels*), i quali mettono in comunicazione i seni venosi della polpa rossa con i manicotti del PALS e i follicoli della polpa bianca (176). Tali portali di comunicazione, caratterizzati da un'interruzione della zona marginale, risultano essere attraversati da linfociti (176). Un lavoro del 2003 nel topo ha tuttavia gettato una nuova luce su questa tematica, generando risultati non pienamente compatibili con l'ipotesi del seno marginale come sede di trasmigrazione linfocitaria (181). Lo studio, effettuato in microscopia intravitale, ha evidenziato come i linfociti non appaiano trasmigrare nel parenchima splenico attraverso il seno marginale, bensì a livello di regioni centrali dei manicotti linfoidi periarteriolari. Nel PALS, le arteriole pulsatili, così definite per l'andamento incostante del loro flusso sanguigno, si ramificano in arteriole terminali, le quali riversano il sangue nel seno marginale all'uscita dal manicotto della polpa bianca. L'extravasazione linfocitaria è stata osservata a livello di canali vascolari "a nido d'ape" che si dipartono dalle arteriole terminali. I linfociti fuoriescono per diversi secondi attraverso uno dei canali, spostandosi dall'arteriola verso la periferia della polpa bianca. Pochi minuti dopo la cessazione del flusso attraverso questo canale, si nota un nuovo efflusso di cellule attraverso un altro canale. Tale alternanza è probabilmente scandita dal flusso sanguigno palpitante delle arteriole pulsatili situate a monte. Lo studio lascia però aperti alcuni interrogativi. I seni marginali sono infatti tappezzati da cellule endoteliali. Le cellule di rivestimento dei canali "a nido d'ape" non manifestano un marcatore tipico delle cellule endoteliali, anche se ciò non basta per escludere che esse siano cellule endoteliali. Anche se non è stato possibile chiarire definitivamente se i canali "a nido d'ape" facciano parte del seno marginale o siano strutture da esso separate, l'extravasazione dei linfociti all'interno del PALS supporta l'ipotesi che essi siano situati nei manicotti, ben a monte dei seni marginali (181). Nel 2019, uno studio ha constatato che il sito preferenziale di extravasazione dei linfociti nella milza è rappresentato dai vasi della polpa rossa (182). Il recettore Clever-1, espresso nei vasi della polpa rossa, si lega ai linfociti B e T $CD8^+$ e ne media la localizzazione splenica (182). Oltre a questo effetto diretto di adesione, Clever-1 potrebbe esercitare anche effetti indiretti sui linfociti: cellule endoteliali spleniche di topi *knockout* per questa proteina mostrano alterazioni dell'espressione genica, tra cui una carenza di CXCL13 nella polpa rossa, ma non nella polpa bianca (182). Nel 2020, in un modello murino, è stato osservato che i linfociti T, una volta extravasati nella polpa rossa e nella zona marginale, raggiungono la zona T della polpa bianca percorrendo delle tracce perivascolari parallele ai vasi sanguigni (183). Tali itinerari risultano delimitati dalla parete vasale e dalle circostanti cellule stromali. Le cellule T transitano lungo tali "*tunnel*" perivasali in verso contrario rispetto al flusso sanguigno dei vasi che vi decorrono paralleli. In tal modo, i linfociti T accedono alla polpa bianca mediante i canali di attraversamento della zona marginale. Il successivo scostamento delle cellule T dalle tracce perivascolari e la loro migrazione nel PALS sono dipendenti da CCR7 (183).

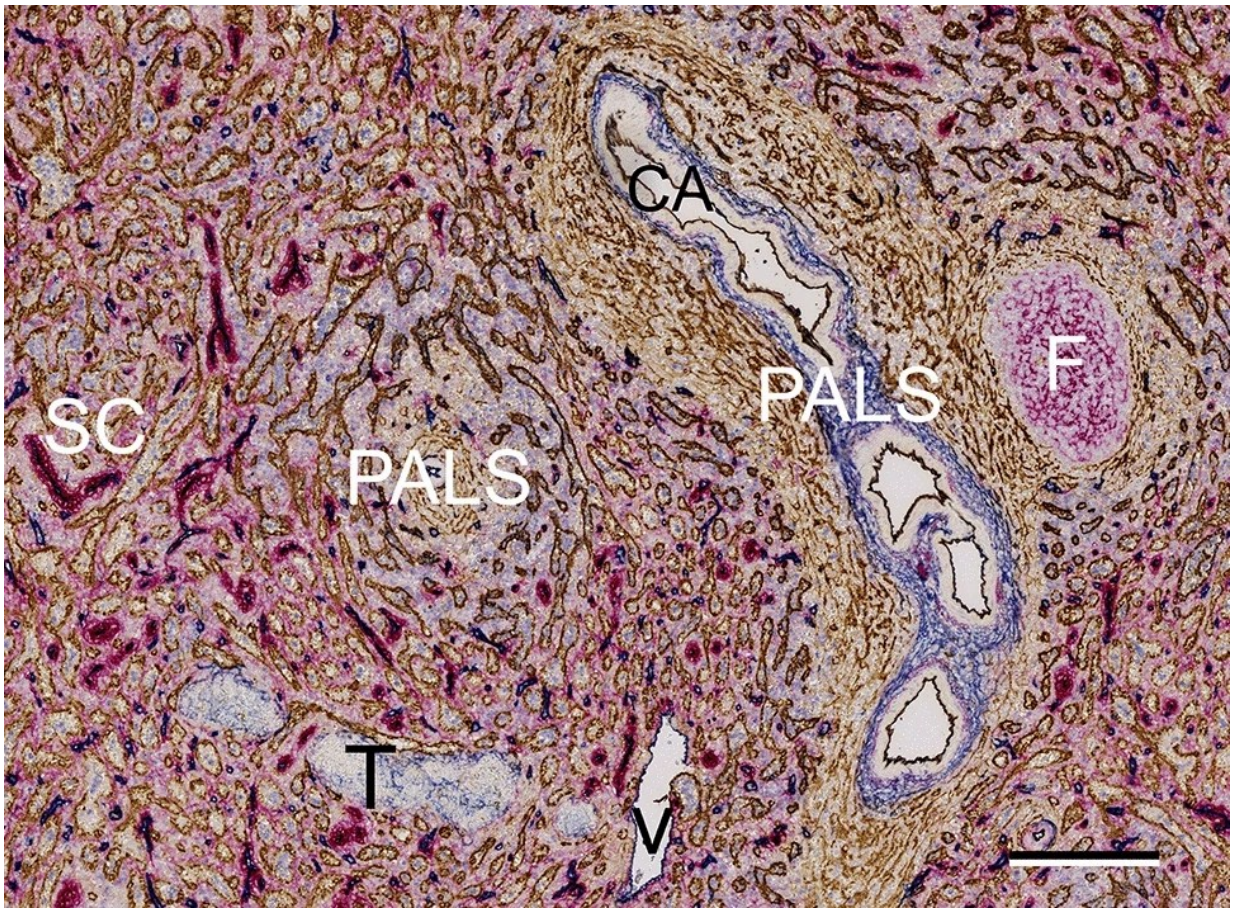

Figura 21. Milza umana (184)**.** Microfotografia di tessuto splenico trattato con marcatori immunoistochimici. L'immagine mostra in dettaglio alcune delle strutture coinvolte nella ricircolazione dei linfociti. Le cellule stromali, marcate in **rosso**, mettono in risalto un follicolo (**F**) e alcuni capillari rivestiti da un guscio di cellule stromali (**SC**). I manicotti del PALS sono invece contraddistinti da una colorazione **marrone-ocra**. Un'arteriola centrale (**CA**) appare ben visibile in sezione all'interno di un manicotto. In basso, è evidente una venula della polpa rossa (**V**).

Migrazione dei linfociti all'interno degli organi linfoidi secondari

Quando i linfociti T e B extravasano nei linfonodi e nella milza, essi iniziano a viaggiare attraverso le aree T muovendosi lungo il reticolo formato dai prolungamenti e dal soma delle cellule fibroblastiche reticolari, con casuali cambi di direzione (185,186). Le cellule fibroblastiche reticolari esprimono CCL21 e, seppur in minor misura, CCL19 (187). Alle chemochine CCL19 e CCL21, e al loro recettore CCR7, espresso sui linfociti T, è attribuito un ruolo centrale nella migrazione e nella segregazione dei linfociti T nelle aree T degli organi linfoidi secondari (188,189). Invero, topi knockout per tali chemochine o per CCR7 mostrano importanti anormalità nella disposizione dei linfociti T nei linfonodi periferici, nelle placche di Peyer e nella polpa bianca della milza (188,189). Ciononostante, CCR7 non può essere l'unico recettore implicato in tale funzionalità: l'assenza di CCR7 riduce solo parzialmente la motilità delle cellule T, indicando il coinvolgimento di altri meccanismi biochimici in questo processo (190,191). Dopo aver inizialmente circolato lungo il reticolo delle cellule fibroblastiche reticolari al pari dei linfociti T, i linfociti B esprimenti il recettore CXCR5 delle chemochine si spostano verso i follicoli e ad essi accedono (192–194). Tale modalità di migrazione è governata dalla chemochina CXCL13, prodotta dalle cellule follicolari dendritiche (192–194). Le plasmacellule secernenti IgG residenti nella milza esprimono il recettore S1P1 a bassi livelli, mentre alcune plasmacellule spleniche e quelle circolanti manifestano più

elevate quantità di S1P1 (195). In ultima analisi, i livelli di espressione di S1P1 determinano la ritenzione delle plasmacellule negli organi linfoidi secondari e la loro migrazione nel midollo osseo (195).

IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA

Lo scopo della risposta anticorpale è quello di difendere l'organismo da microrganismi extracellulari: gli anticorpi si diffondono nei fluidi biologici, ma non all'interno delle cellule (1). Possono quindi interagire solo con materiale extracellulare, avviando esclusivamente su di esso le funzioni effettrici. Il ruolo di difesa dai microrganismi intracellulari spetta all'immunità cellulo-mediata, il cui espletamento presuppone il riconoscimento da parte dei linfociti T di peptidi antigenici inseriti in complessi MHC. In senso ampio, l'immunità cellulo-mediata rappresenta la funzione effettrice dei linfociti T, in quanto per il suo trasferimento da un individuo immunizzato ad uno vergine è necessaria la somministrazione di cellule T vitali. L'immunità cellulo-mediata assume un'importanza fondamentale nelle infezioni da virus e batteri intracellulari, ma attua anche le reazioni di rigetto dei trapianti allogenici, basate sul riconoscimento di molecole MHC eterologhe. Sono essenzialmente due le funzioni effettrici dell'immunità cellulo-mediata. Una è la stimolazione dell'attività microbicida dei fagociti. L'attività di fagocitosi è sfruttata dall'immunità innata per debellare le infezioni, tuttavia molti microrganismi hanno evoluto sistemi per sopravvivere anche all'interno dei fagociti. I linfociti T helper della sottopopolazione Th1 e i linfociti T citotossici secernono IFN-γ, citochina attivante i fagociti. I linfociti T producono anche TNF e linfotossina, che favoriscono il reclutamento dei leucociti nel focolaio infiammatorio. L'attività dei macrofagi può condurre ad un danno ai tessuti circostanti noto come reazione da ipersensibilità ritardata. L'altra funzione dell'immunità cellulo-mediata è l'uccisione delle cellule infettate da un microrganismo intracellulare ad opera dei linfociti T citotossici. Tale processo può verificarsi anche a carico di fagociti, qualora il microrganismo evadesse dai fagosomi e si addentrasse nel citoplasma, proteggendosi quindi dalla funzione microbicida della cellula. La sottopopolazione dei linfociti Th2 svolge una funzione inibitoria sull'attivazione dei macrofagi, limitando i fenomeni di ipersensibilità ritardata. Le cellule NK svolgono anch'esse una funzione citotossica nell'ambito dell'immunità innata (1).

Reazioni immunitarie agli antigeni fagocitati

Nell'immunità cellulo-mediata contro gli antigeni fagocitati, i linfociti T attuano il riconoscimento dell'antigene, assicurando la specificità della reazione, e guidano la risposta microbicida dei fagociti mediante le citochine, tracciando un importante collegamento tra l'immunità innata e quella adattativa (1). L'attivazione dei macrofagi da parte dei linfociti T richiede vari eventi a monte per potersi verificare. Dapprima deve avvenire il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T nei linfonodi o in altri distretti linfoidi secondari. Le cellule T si attivano, proliferano e si differenziano in linfociti T effettori, i quali migrano nel focolaio di infezione assieme ad altri leucociti. In tale sede, i linfociti T helper effettori possono riconoscere l'antigene presentato dai macrofagi e attivare quest'ultimi prevalentemente attraverso citochine (1).

Induzione delle risposte cellulo-mediate

La fase di induzione dell'immunità cellulo-mediata ha inizio con il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T vergini negli organi linfoidi secondari, a cui conseguono l'attivazione, l'espansione clonale e la differenziazione delle cellule T in linfociti T effettori (1). La reazione si esplica in risposta a microrganismi fagocitati, e ad antigeni proteici solubili somministrati con adiuvanti. Il fenomeno coinvolge sia i linfociti T $CD4^+$ che i linfociti $CD8^+$; le cellule T $CD4^+$ vanno incontro ad una notevole proliferazione, mentre i linfociti T CD8+ subiscono un'espansione clonale ancor maggiore. I prodotti microbici e gli adiuvanti, attraverso recettori dell'immunità innata, stimolano le APC ad esprimere molecole costimolatorie, quali CD80 e CD86, e a secernere citochine, di cui IL-12, che favorisce la differenziazione dei linfociti T in Th1. Invero, una parte dei linfociti T attivati si differenzia in cellule Th1 sotto l'influsso dell'IL-12. L'IL-12 è secreta da macrofagi e cellule dendritiche in risposta all'interazione di CD40 con CD40L, a prodotti microbici, o all'IFN-γ. Uno dei più potenti stimoli per la secrezione di IL-12 è il LPS. A seguito dell'attivazione, i linfociti T esprimono CD40L, che legandosi a CD40 delle APC, induce la secrezione di IL-12 da parte di queste ultime. I linfociti T e le cellule NK, nel corso delle loro risposte, producono IFN-γ; questo, nell'ambito di un circuito di amplificazione, stimola nelle cellule dendritiche e nei macrofagi la produzione di IL-12, che promuove la differenziazione dei linfociti T $CD4^+$ in Th1. Tra le citochine, l'IL-12 è quella che riveste una funzione di maggior rilievo nell'attivazione dell'immunità cellulo-mediata. Lo stesso ruolo può tuttavia essere svolto da altre citochine prodotte dai macrofagi, tra cui l'IL-18. Alcuni dei linfociti T attivati si trasformano in cellule della memoria a lunga emivita, normalmente quiescenti, ma in grado di riattivarsi alle successive esposizioni all'antigene. I linfociti T effettori e quelli della memoria si trasferiscono dagli organi linfoidi secondari al circolo generale, dal quale possono venire reclutati a livello dei tessuti colonizzati dall'antigene (1).

Funzioni effettrici dei linfociti T: aspetti anatomici e istologici

Affinché i linfociti T effettori possano espletare le loro funzioni effettrici, devono venire in contatto con APC che presentino lo stesso antigene che, negli organi linfoidi secondari, ha attivato precedentemente la risposta (1). Per poter interagire con fagociti che hanno inglobato microrganismi all'interno di organi linfoidi come la milza e i linfonodi, i linfociti T che si attivano nello stesso distretto possono districarsi nel parenchima dell'organo. La necessità di risposte cellulo-mediate può però presentarsi in qualsiasi tessuto dell'organismo. I linfociti T effettori e della memoria devono essere quindi in grado di fuoriuscire dal torrente circolatorio per addentrarsi nei focolai d'infezione. La fase iniziale dell'infiammazione tissutale prevede generalmente un massivo reclutamento leucocitario, come parte dell'immunità innata. I linfociti T, una volta intervenuti, promuovono un ulteriore reclutamento di leucociti nel tessuto. Nei casi di soggetti già sensibilizzati ad un antigene, tuttavia, la reazione da ipersensbilità ritardata può manifestarsi anche in assenza di un infiltrato leucocitario iniziale (1).

Reclutamento dei leucociti nei tessuti: aspetti biochimici e istologici

La migrazione dei leucociti nei tessuti è regolata da citochine prodotte da macrofagi e da cellule endoteliali a seguito dell'attivazione da parte di prodotti microbici, e anche dai linfociti T nelle fasi più avanzate dell'infiammazione (1). Le citochine inducono l'espressione di molecole

di adesione sulle cellule endoteliali vascolari, promuovendo la chemiotassi dei leucociti. Le citochine più importanti in questo processo sono TNF e le chemochine. Il TNF attiva le cellule endoteliali promuovendovi l'espressione delle molecole di adesione. I leucociti, una volta aderiti all'endotelio, possono attraversare la parete capillare seguendo un gradiente di chemochine. Il TNF induce inoltre la produzione di prostaciclina (PGI2) nelle cellule endoteliali. PGI2 ha un effetto vasodilatatore, aumentando l'irrorazione locale e quindi anche l'afflusso di leucociti. Per di più, TNF e IFN-γ provocano un rimodellamento delle cellule endoteliali e della membrana basale dei capillari, facilitando l'extravasazione delle cellule e la diffusione di macromolecole nel tessuto. Nonostante i macrofagi e le cellule NK producano tali citochine già durante le risposte innate, i linfociti T ne secernono in quantità ben maggiori. L'essudazione di fibrinogeno ha un ruolo fondamentale nelle manifestazioni indurative che si verificano nell'ipersensibilità ritardata. La deposizione tissutale di fibrinogeno, fibrina e fibronectina costituisce un reticolo che accoglie ed intrappola i leucociti extravasati nel tessuto infiammato (1).

Reclutamento dei linfociti T effettori e della memoria nei focolai infettivi: aspetti biochimici e istologici

I linfociti T effettori e della memoria esprimono molecole di adesione, specificamente selectine ed integrine, che mediano il loro reclutamento nei focolai infiammatori ed infettivi (1). Tali molecole sono presenti anche sugli altri leucociti, ove svolgono le stesse funzioni. I linfociti T effettori e della memoria migrano nei tessuti infetti, a differenza dei linfociti T vergini, che si trasferiscono invece preferenzialmente nei linfonodi al fine di stabilire il primo incontro con l'antigene. Alla base di questo fenomeno vi è la divergente espressione delle molecole di adesione tra i due stadi cellulari: rispetto alle cellule T vergini, i linfociti T attivati esprimono ligandi per la E-selectina e la P-selectina e livelli più elevati delle integrine LFA-1 e VLA-4. I linfociti T vergini presentano invece notevoli quantità di L-selectina, il cui ligando è espresso sulle venule ad endotelio alto (HEV) degli organi linfoidi secondari. L'endotelio dei focolai infiammatori esprime quantità di E-selectina, P-selectina, e ligandi per le integrine dei linfociti T attivati superiore rispetto agli endoteli dei tessuti sani. La migrazione dei linfociti T effettori e della memoria nei focolai d'infezione non è un fenomeno antigene-specifico, poiché è controllata esclusivamente dalle molecole di adesione. Pertanto, il reclutamento coinvolge cellule T effettrici e della memoria indipendentemente dalla specificità del loro recettore. La successiva interazione dei linfociti T con l'antigene media invece la ritenzione a livello tissutale delle sole cellule antigene-specifiche. I linfociti T che riconoscono l'antigene presentato dai macrofagi e da altre APC ricevono da questi ultimi dei segnali che inducono l'aumento dell'affinità delle integrine per i loro ligandi. Le integrine VLA-4 e VLA-5 si legano alla fibronectina della matrice extracellulare, mentre CD44, anch'esso espresso ad alti livelli dalle cellule T effettrici e della memoria, interagisce con l'acido ialuronico. Come risultato di tali eventi, i linfociti T specifici per l'antigene vengono trattenuti nel tessuto, mentre quelli non specifici transitano nei vasi linfatici per ritornare al circolo generale. Riconosciuto l'antigene in un tessuto periferico, i linfociti T effettori vanno incontro ad attivazione ed iniziano a svolgere le loro funzioni. Nell'ambito dell'immunità cellulo-mediata, essi generano segnali che stimolano l'attività microbicida dei macrofagi e secernono citochine che promuovono il processo infiammatorio (1).

Attivazione dei macrofagi

I macrofagi attivati rappresentano le cellule effettrici dell'immunità cellulo-mediata, eliminando di fatto i microrganismi (1). I monociti reclutati nei tessuti, una volta esposti ai segnali che i linfociti Th1 producono in risposta all'antigene incontrato nel tessuto, si trasformano in macrofagi attivati, in grado di uccidere i microbi fagocitati. La conversione del monocita in macrofago attivato prevede un'alterazione quantitativa dell'espressione di alcune proteine. Tali proteine sono responsabili delle differenze funzionali che si riscontrano tra monociti e macrofagi attivati. I linfociti Th1 effettori e della memoria attivano i macrofagi mediante l'espressione CD40L, che si lega a CD40 dei macrofagi, e la secrezione di citochine di cui l'IFN-γ. L'IFN-γ evoca nei macrofagi alcune funzioni, e aziona ulteriori risposte se presente in combinazione con CD40 e il LPS. La necessità dell'interazione CD40-CD40L garantisce l'attivazione dei soli macrofagi che presentano l'antigene ai linfociti T. Anche i linfociti T $CD8^+$ possono determinare l'attivazione dei macrofagi sfruttando gli stessi meccanismi biochimici, pur riconoscendo solo gli antigeni presentati in associazione a molecole MHC I (1).

Risposte dei macrofagi: aspetti biochimici e istologici

I segnali apportati da CD40 e dall'IFN-γ inducono un aumento della sintesi di molte proteine nel macrofago (1). CD40 attiva i fattori di trascrizione NF-κB e AP-1, mentre l'interferone-γ aziona i fattori STAT1 e IRF-1. Un simile processo di attivazione si verifica nell'immunità innata, ed è avviato da prodotti microbici quali l'LPS e dall'interferone-γ secreto dalle cellule NK. In ogni caso si ha un'induzione delle proteine responsabili delle funzioni effettrici. Tra di esse figurano l'ossidasi fagocitica, un complesso enzimatico che genera intermedi reattivi dell'ossigeno, e la sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS). L'ossido nitrico e gli intermedi reattivi dell'ossigeno esercitano un'azione battericida. Rispetto ai macrofagi quiescenti, i macrofagi attivati riportano maggiori livelli di enzimi lisosomiali, i quali operano la degradazione dei microbi fagocitati una volta che i fagosomi si fondono con i lisosomi. Gli enzimi lisosomiali, l'ossido nitrico e gli intermedi reattivi dell'ossigeno possono inoltre essere riversati nell'ambiente extracellulare, ove uccidono i microrganismi ivi presenti; queste sostanze possono al contempo cagionare un danno ai tessuti sani. I macrofagi attivati secernono citochine quali TNF, IL-1 e chemochine, e mediatori lipidici di cui PAF (*Platelet Activating Factor*), prostaglandine e leucotrieni. Questi mediatori promuovono uno stato flogistico locale, con un infiltrato composto principalmente da neutrofili, i quali sono anch'essi fagociti. I macrofagi e i neutrofili attivati, oltre a fagocitare i microrganismi, rimuovono anche le componenti tissutali danneggiate dall'infiammazione. Nella fase di riparazione tissutale successiva all'eliminazione della noxa patogena, i macrofagi attivati inducono la formazione di tessuto cicatriziale. A tale scopo, essi secernono fattori di crescita per i fibroblasti come PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), mediatori che stimolano la sintesi di collagene quali TGF-β, e fattori di neoangiogenesi come FGF (*Fibroblast Growth Factor*). I macrofagi attivati sono anche maggiormente efficienti come APC rispetto ai macrofagi quiescenti, a causa dell'aumentata espressione delle proteine che attuano la processazione e la presentazione dell'antigene. Tra queste si trovano il proteasoma, la catepsina, le molecole MHC II, i costimolatori e le citochine. In questo modo, i macrofagi attivati potenziano l'attivazione dei linfociti T in un circuito di amplificazione. Le sostanze liberate dai macrofagi provocano danno tissutale di limitata entità che normalmente si risolve dopo che l'infezione è stata debellata. Tuttavia, se i macrofagi attivati non riescono ad eliminare il microbo in tempi brevi, il processo

infiammatorio si protrae nel tempo, con lesioni tissutali estese in cui il tessuto originario viene rimpiazzato da tessuto connettivo fibroso. Questo processo, chiamato fibrosi, insorge come conseguenza delle risposte da ipersensibilità ritardata croniche. I macrofagi coinvolti nell'infiammazione cronica subiscono modificazioni prodotte dalla persistente azione delle citochine. Il loro volume citoplasmatico e il loro contenuto di organelli sono incrementati. Tali macrofagi sono definiti cellule epitelioidi vista la loro somiglianza alle cellule epiteliali. Talora i macrofagi possono fondersi tra loro originando cellule giganti multinucleate, anche chiamate cellule di Langhans. Queste forme di macrofagi attivati possono formare granulomi, ossia aggregati organizzati attorno a particelle antigeniche, spesso circondati da formazioni fibrose. Tale forma di ipersensibilità ritardata è propria di patologie causate da microrganismi persistenti e difficilmente eliminabili, quali il micobatterio della tubercolosi e alcuni miceti. Sebbene la cicatrizzazione sia un processo fondamentale per ristabilire l'integrità del tessuto, la progressiva trasformazione fibrotica di un organo ne determina la disfunzione. Questo accade, ad esempio, proprio nella tubercolosi: i granulomi tubercolari, sempre più numerosi ed ampi, sino a formare caverne, depletano gradualmente il parenchima polmonare nel corso della malattia (1).

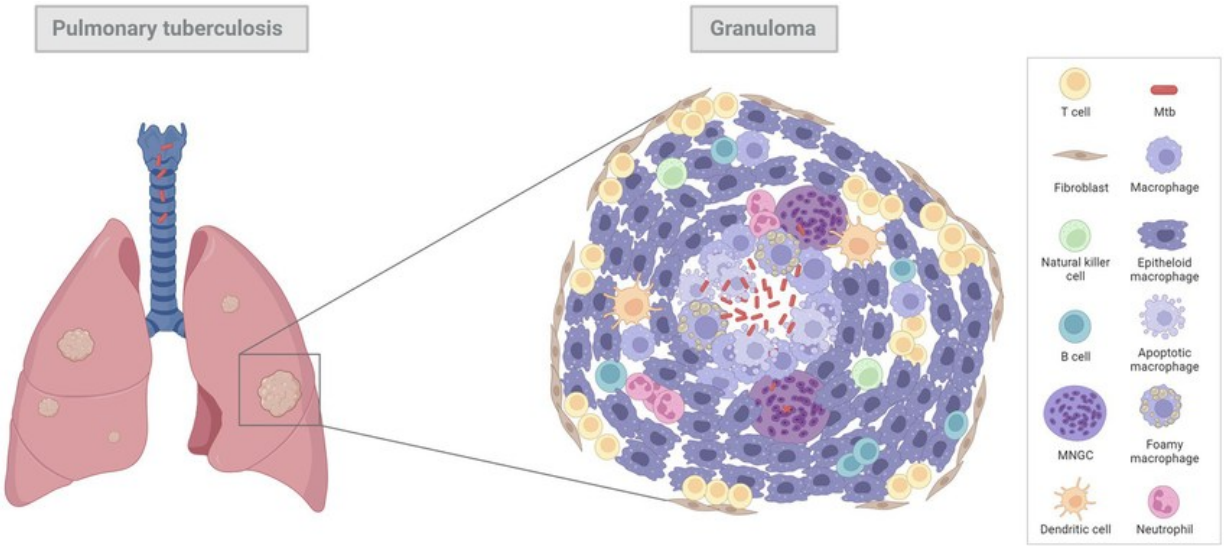

Figura 22. Granuloma tubercolare (196)**.** Il disegno raffigura la composizione cellulare di un granuloma tubercolare, con una legenda rappresentativa dei vari tipi cellulari. **Mtb**: *Mycobacterium tuberculosis*; **MNGC**: cellula gigante multinucleata. Riprodotto su licenza CC BY 4.0.

Funzioni effettrici dei linfociti T citotossici

Avvenuta la loro maturazione nel timo, i linfociti T $CD8^+$ sono immessi nella circolazione in uno stato non pienamente differenziato, nel quale non sono in grado di esercitare l'attività citotossica (1). In questo stadio, essi sono definiti "pre-CTL". L'inizio delle risposte dei linfociti T citotossici richiede l'attivazione dei pre-CTL, la loro espansione clonale e il differenziamento in linfociti T citotossici effettori. Al pari dei linfociti T $CD4^+$, i linfociti T $CD8^+$ richiedono due segnali per l'attivazione. Il primo consiste nel riconoscimento dell'antigene, di origine microbica o tumorale, presentato attraverso molecole MHC I. Un'eccezione è rappresentata dai linfociti T citotossici $CD4^+$, che riconoscono solo complessi MHC II. Il secondo segnale può essere fornito da molecole costimolatorie o da citochine. Le molecole MHC I sono espresse da tutte le cellule nucleate, tuttavia la generazione di segnali costimolatori e la secrezione di

citochine non sono appannaggio di tutte le cellule. In molti casi, quindi, i pre-CTL non ricevono il secondo segnale dalla stessa cellula di cui riconoscono il complesso MHC I. Cellule infettate o tumorali possono essere inglobate da APC professionali, e qualora gli antigeni venissero trasferiti dai fagosomi al citosol, essi verrebbero processati ed esposti in molecole MHC I. In tal caso, i pre-CTL potrebbero riconoscere su APC professionali un antigene proveniente da un'altra cellula in un fenomeno chiamato cross-presentazione, e ricevere il secondo segnale dalle stesse APC professionali. Alternativamente, il secondo segnale può essere fornito dai linfociti T *helper*. Questi ultimi possono favorire l'attivazione dei pre-CTL secernendo citochine quali l'IL-2, che agisce sui pre-CTL promuovendone l'espansione clonale e la differenziazione. Allo stesso tempo, i linfociti T *helper* esprimono CD40L, che si lega a CD40 delle APC attivando queste ultime ed incrementandone l'efficienza nell'attivazione dei linfociti T $CD8^+$. I linfociti T *helper* hanno un ruolo molto importante nell'attivazione dei linfociti T $CD8^+$; difatti l'HIV, virus che infetta selettivamente cellule esprimenti CD4, provoca nei pazienti colpiti la progressiva deplezione non solo delle cellule T *helper*, ma anche dei linfociti T citotossici. L'attivazione dei pre-CTL conduce alla loro espansione clonale e alla differenziazione in linfociti T citotossici effettori dotati delle funzioni citolitiche. Tale differenziazione prevede lo sviluppo dell'apparato biochimico e degli organelli intracellulari necessari per l'azione citotossica. In particolare, si ha la formazione di granuli contenenti perforine e granzimi, proteine ad attività citolitica. I linfociti T $CD8^+$ acquisicono inoltre la capacità di trascrivere geni di citochine, quali TNF, IFN-γ e linfotossina, i quali attivano i fagociti favorendo l'infiammazione. Nel corso di infezioni virali si assiste ad una massiva espansione clonale delle cellule T $CD8^+$; nel topo si registra un aumento di 50000-100000 volte dei linfociti T $CD8^+$ specifici per il virus nella fase acuta dell'infezione, e oltre 1/3 delle cellule spleniche può essere indirizzato contro gli antigeni del virus. Nell'uomo, nella fase acuta delle infezioni da HIV e EBV, circa il 10% cellule T circolanti sono dirette contro gli antigeni virali (1).

Attività citolitica dei linfociti T citotossici

La lisi delle cellule da parte dei linfociti T citotossici è caratterizzata dalla specificità antigenica (1). L'azione citotossica si estende infatti solo ed esclusivamente alle cellule che espongono, attraverso molecole MHC di classe I, l'antigene che ha stimolato l'attivazione dei pre-CTL. Il contatto tra linfocita e cellula bersaglio è quindi necessario ai fini dell'espletamento della funzione citolitica. Ciò garantisce la specificità del ruolo delle cellule T citotossiche, cosicché le cellule adiacenti sono protette dal danno. L'attività dei linfociti T citotossici è suddivisibile in quattro fasi di cui, sequenzialmente, il riconoscimento dell'antigene, la fase di attivazione dei linfociti T citotossici, l'inflizione del "colpo mortale", e il distacco del linfocita dalla cellula bersaglio (1).

Riconoscimento dell'antigene e attivazione del linfocita T citotossico

Per l'interazione con la cellula bersaglio, il linfocita T citotossico impiega il TCR e molecole accessorie quali CD8 e l'integrina LFA-1 (1). La cellula bersaglio deve esprimere il complesso MHC di classe I complementare al TCR e la molecola ICAM-1, controrecettore di LFA-1. Una volta che il coniugato linfocita-cellula bersaglio si è formato, avviene l'aggregazione del TCR, che origina una cascata di segnali simile a quella che causa l'attivazione dei linfociti T *helper*, la quale attiva i linfociti T citotossici. Pur essendo le molecole costimolatorie e le citochine

necessarie per l'espansione clonale e la differenziazione dei pre-CTL, non sono richieste per l'innesco della funzione citotossica nei CTL effettori (1).

Inflizione del "colpo mortale"

Entro pochi minuti dal contatto fra linfocita T citotossico e la cellula bersaglio, quest'ultima subisce dei cambiamenti irreversibili che la conducono alla morte in 2-6 ore (1). Tale processo non si arresta al distacco del linfocita della cellula, pertanto si usa dire che il CTL infligga un "colpo mortale" alla cellula. La lisi cellulare mediata da linfociti T citotossici è principalmente attuata per liberazione delle proteine dei granuli in corrispondenza della membrana della cellula bersaglio. A seguito del riconoscimento antigenico, il citoscheletro del CTL subisce profondi riarrangiamenti che spostano il centro di organizzazione dei microtubuli in prossimità della zona di contatto con la cellula da uccidere. Come risultato, i granuli contenenti le proteine citotossiche vengono proiettati verso tale area, sino alla fusione delle loro membrane con quella cellulare e alla conseguente esocitosi del loro contenuto sulla superficie della cellula bersaglio (1). Ai rimodellamenti del citoscheletro che presiedono all'esocitosi dei granuli dei CTL partecipano GTP-asi appartenenti alle famiglie Rho e Rab (197–199). Le proteine più importanti nell'espletamento dell'azione citotossica sono la perforina e i granzimi (1). La perforina si trova allo stato monomerico nei granuli dei linfociti T citotossici e delle cellule NK. Al momento dell'esocitosi, le elevate concentrazioni di Ca^{2+} extracellulari portano i monomeri di perforina alla polimerizzazione. Questa avviene preferenzialmente a livello della membrana plasmatica della cellula bersaglio, con le unità di perforina che si dispongono a formare ampi pori di membrana, permeabili all'acqua e ai soluti: la cellula va incontro a squilibrio idro-elettrolitico e osmolare. La morte cellulare avviene per il massivo ingresso di acqua, che procura la lisi osmotica della cellula, e per l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+}, che scatena il programma apoptotico. La perforina è omologa alla componente C9 del complemento, che dà luogo ad un complesso di membrana con la stessa funzione dei canali formati dalla perforina. I granzimi sono proteasi seriniche. Il più importante di essi, il granzima B, effettua il taglio proteolitico del substrato in corrispondenza di residui di aspartato. I granzimi attraversano i canali costituiti dalla perforina, penetrando nella cellula bersaglio. Una volta al suo interno, tagliano ed attivano le caspasi, avviando il meccanismo apoptotico. L'azione dei granzimi e della perforina non danneggia il linfocita T citotossico, probabilmente poiché il flusso esocitotico dei granuli è rivolto prevalentemente verso la cellula bersaglio, cosicché le unità di perforina non si inseriscono nella membrana del linfocita. I CTL si avvalgono anche di un altro processo di lisi cellulare. I linfociti T citotossici attivati esprimono il ligando di Fas (FasL), che si lega al suo controrecettore Fas, presente su diversi tipi cellulari. Il legame di FasL a Fas conduce, nella cellula che esprime Fas, all'attivazione delle caspasi e dell'apoptosi. Quest'ultimo meccanismo riveste tuttavia una rilevanza secondaria nella funzione dei CTL rispetto ai precedenti. Il ruolo dei linfociti T citotossici nelle infezioni da microrganismi intracellulari risiede nell'eliminazione del serbatoio di infezione. La caspasi attivate dai granzimi e da Fas nella cellula bersaglio tagliano molteplici substrati, di cui le nucleoproteine, e attivano enzimi che degradano il DNA. Questi ultimi disgregano sia il DNA cellulare che quello microbico (1).

Distacco del linfocita T citotossico dalla cellula bersaglio

Compiuta l'inflizione del "colpo mortale", il linfocita T citotossico si dissocia dalla cellula bersaglio, spesso prima che quest'ultima vada incontro a morte. Il distacco è favorito da una diminuzione dell'affinità delle molecole accessorie (1).

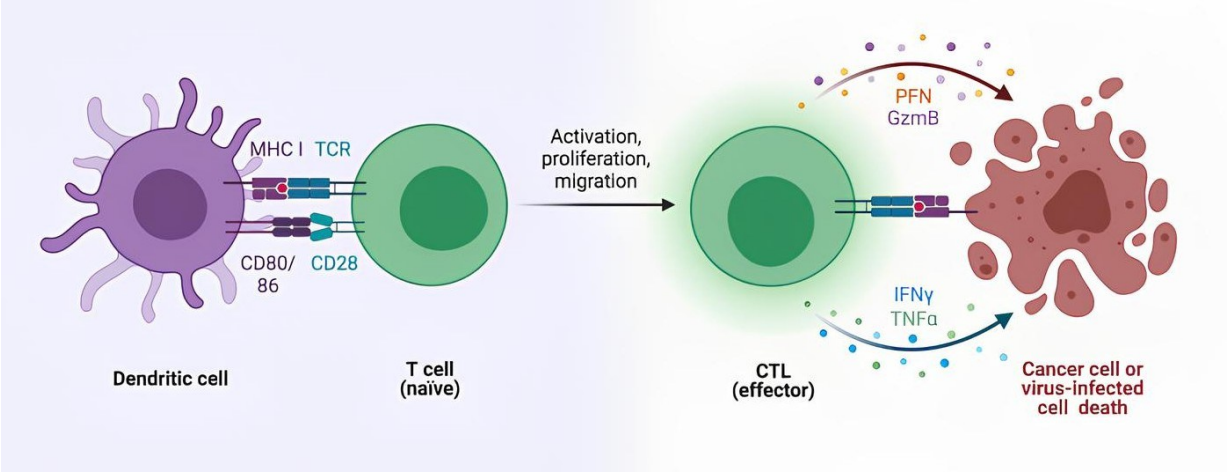

Figura 23. Attività dei linfociti T citotossici (200)**.** A **sinistra**, interazione del linfocita T citotossico vergine con una cellula dendritica, con riconoscimento antigenico e segnali costimolatori. A **destra**, attività citotossica contro cellule cancerose o infette da virus, con secrezione di perforine (**PFN**), granzimi (**GzmB**, granzima B) e citochine.

Ruolo dei linfociti Th2 nelle risposte immunitarie

Nell'ambito dell'immunità cellulo-mediata, i linfociti Th2 hanno un ruolo di soppressione del processo infiammatorio (1). Tale funzionalità si esplica con la secrezione di citochine inibenti l'attivazione dei macrofagi. Le cellule Th2, sopprimono l'attività macrofagica producendo IL-4 e IL-13, antagonisti dell'IFN-γ. L'IL-10, un'altra citochina di derivazione Th2, inibisce in maniera diretta l'attivazione dei macrofagi. Una polarizzazione in senso Th2, che può avvenire negli stadi più tardivi della risposta agli antigeni, ha il compito di limitare i danni tissutali che possono caratterizzare le risposte cellulo-mediate. Alcuni linfociti T inibiscono l'espansione clonale e le funzioni effettrici dei linfociti T e l'attività dei macrofagi secernendo TGF-β. Al di là del loro ruolo immunosoppressore nell'immunità cellulo-mediata, le cellule Th2 mediano risposte alle infezioni da elminti e alle infestazioni da ectoparassiti. Gli elminti, al contrario di molti batteri e virus, sono molto meno suscettibili all'azione microbicida dei macrofagi. Le cellule Th2 secernono IL-4, che stimola la produzione di IgE specifiche per l'agente patogeno, e IL-5 che attiva i granulociti eosinofili. Gli eosinofili si legano alle IgE che opsonizzano il parassita tramite i recettori Fcε che esprimono. A tal punto, gli eosinofili disgregano il tegumento dell'elminta. Anche i mastociti sono dotati di recettori Fcε, e sono quindi capaci di legare complessi IgE-antigene. Quando ciò accade, i mastociti degranulano rilasciando istamina, serotonina, citochine quali il TNF e mediatori lipidici, in grado di instaurare un processo flogistico locale (1).

IMMUNITÀ UMORALE

Anticorpi neutralizzanti

Il legame degli anticorpi ai microrganismi o alle tossine da essi rilasciate ne impedisce l'interazione con i componenti cellulari, e quindi l'attività biologica (1). Molti agenti patogeni si legano a proteine espresse sulle cellule dell'ospite tramite molecole di superficie di cui sono dotati, al fine di penetrare nelle cellule. Un esempio è l'HIV, la cui glicoproteina gp120 media il legame al recettore CD4 e ai co-recettori CCR5 oppure CXCR4. Gli anticorpi specifici per queste molecole possono esercitare un ingombro sterico, inficiando sulla capacità del microbo di interagire con i recettori cellulari. In alternativa, l'interazione di tali anticorpi con le molecole di superficie del microrganismo può determinare deformazioni di queste ultime, in un fenomeno allosterico che riduce l'affinità delle molecole per i recettori cellulari. Il meccanismo d'azione di molte tossine microbiche implica il legame ad un recettore o ad un altro componente cellulare e la sua conseguente disfunzione. Anticorpi diretti contro queste tossine forniscono un ingombro sterico che impedisce l'interazione della tossina con il suo bersaglio. Gli anticorpi neutralizzanti presenti nel siero appartengono prevalentemente all'isotipo IgG, mentre quelli contenuti nelle secrezioni mucose sono in maggioranza IgA. Indipendentemente dall'isotipo, l'efficacia degli anticorpi neutralizzanti dipende dall'affinità per l'antigene, che viene ottimizzata dal processo di maturazione dell'affinità. Per evadere le difese opposte dall'ospite attraverso gli anticorpi neutralizzanti, i microrganismi hanno sviluppato meccanismi per variare gli antigeni di superficie (1).

Opsonizzazione

Un meccanismo di fagocitosi dell'immunità innata prevede che alcuni recettori espressi sulla membrana dei fagociti leghino direttamente i microrganismi, permettendone così l'endocitosi (1). Vi sono poi altri sistemi mediante i quali la fagocitosi si compie. Gli anticorpi IgG, riconoscendo gli antigeni di superficie di un microrganismo, lo ricoprono. I fagociti mononucleati e i neutrofili esprimono recettori per il frammento Fc delle IgG, i quali si legano agli anticorpi a loro volta ancorati al microbo e avviano l'internalizzazione del complesso. Il fenomeno di rivestimento di una particella estranea da parte di agenti che ne promuovono la fagocitosi è noto come opsonizzazione, e sono chiamate opsonine le molecole che svolgono tale funzione di ricopertura. I recettori Fc espressi sui fagociti mediano la fagocitosi del materiale opsonizzato e trasducono all'interno della cellula segnali che ne stimolano la capacità microbicida. I recettori Fc sono espressi su molte popolazioni di leucociti; tuttavia, gli unici responsabili della fagocitosi mediata da anticorpi sono i recettori per la porzione cristallizzabile delle IgG, chiamati Fcγ. Esistono diversi tipi di recettori Fcγ, ciascuno con un caratteristico profilo di affinità per le varie sottoclassi di IgG. Nei fagociti, il principale recettore Fcγ è FcγRI, il quale ha elevata affinità per le IgG1 e IgG3 umane e le IgG2a e IgG2b murine, e più scarsa affinità per le IgG2 e le IgG4 umane. FcγRI è composto da una catena α, coinvolta nel legame all'anticorpo, associata non covalentemente a due catene γ, tra loro legate da un ponte disolfuro. Le catene γ, omologhe alla catena ζ del TCR, effettuano la trasduzione del segnale, essendo dotate di motivi ITAM nella loro porzione intracitoplasmatica. Il legame di un grande numero anticorpi ad una particella o ad una macromolecola porta alla formazione di un complesso multivalente che ha avidità ben maggiore per i recettori Fcγ rispetto alle IgG libere. Per ogni recettore Fcγ, le opsonine più

efficaci sono le sottoclassi anticorpali per le quali il recettore è maggiormente affine. All'interazione delle particelle opsonizzate con i recettori Fc consegue l'internalizzazione del complesso in vescicole fagocitiche, le quali si fondono successivamente con i lisosomi. Nei fagolisosomi, il materiale fagocitato va incontro a digestione. La trasduzione intracellulare del segnale implica l'attivazione di alcune tirosin-chinasi. Alcuni dei risultati sono l'accensione dell'ossidasi fagocitica e la secrezione di intermedi reattivi dell'ossigeno ed enzimi in ambiente extracellulare. Quest'ultimo fenomeno favorisce il debellamento di microrganismi non fagocitabili, quali gli elminti, pur producendo danno tissutale. Topi con knockout di catene di FcγRI mostrano un deficit delle risposte umorali, ma risultano protetti dai danni tissutali da esse causati. L'espressione di FcγRI nei macrofagi è indotta dall'IFN-γ, il quale media al contempo lo scambio isotipico proprio verso le sottoclassi anticorpali che meglio si legano a tale recettore. L'IFN-γ stimola inoltre l'attività microbicida dei fagociti. Al di là delle Ig, un'altra importante opsonina è il frammento C3b del complemento. Questa proteina si lega alla superficie dei microrganismi e media la fagocitosi interagendo con determinati recettori espressi sui fagociti (1).

Citotossicità cellulare mediata da anticorpi

Per citotossicità cellulare mediata da anticorpi (ADCC) si intende l'uccisione di una cellula opsonizzata da anticorpi da parte di una cellula effettrice, mediante un meccanismo citotossico diverso dalla fagocitosi (1). Gli anticorpi fungono da ponte fra i recettori Fc della cellula effettrice e la cellula bersaglio. L'aggregazione dei recettori Fc è necessaria per l'innesco dell'evento citotossico, cosicché le Ig complessate ad una cellula consentono l'attivazione. La natura della risposta citotossica dipende dall'integrazione di molti fattori, tra cui l'isotipo e la sottoclasse anticorpale, il tipo di recettore Fc, la presenza di altre molecole di segnale, il tipo di cellula effettrice e il tipo di cellula bersaglio. La cascata di trasduzione che consegue all'aggregazione dei recettori Fc conduce all'esocitosi del contenuto dei granuli della cellula effettrice e all'espressione di marcatori di attivazione quali CD69 e CD25 i recettori FcγRIIIa espressi sulle cellule NK interagiscono con IgG legate alla superficie di una cellula, la quale va incontro a lisi. FcγRIIIa è dotato di bassa affinità per le IgG, e a queste si lega solo quando ricoprono la superficie di una cellula, non quando si trovano in forma libera. FcγRIIIa è presente anche su monociti, macrofagi e cellule dendritiche. I segnali trasdotti da FcγRIIIa all'interno della cellula NK ne attivano la produzione e la secrezione di citochine e l'esocitosi del contenuto dei loro granuli. Gli eosinofili sono i fautori dell'ADCC contro gli elminti. Tali microrganismi non sono soggetti a fagocitosi, date le loro grandi dimensioni, e il loro tegumento è estremamente resistente alle sostanze microbicide riversate dai neutrofili e dai macrofagi nell'ambiente extracellulare. La proteina basica maggiore degli eosinofili è invece in grado di degradare il tegumento degli elminti. Una volta che gli elminti sono stati ricoperti dalle IgE, gli eosinofili si legano alla porzione Fc di tali anticorpi opsonizzanti tramite il recettore FcεRI. Gli eosinofili vengono così attivati e rilasciano il contenuto dei loro granuli, con la conseguente uccisione del microrganismo (1).

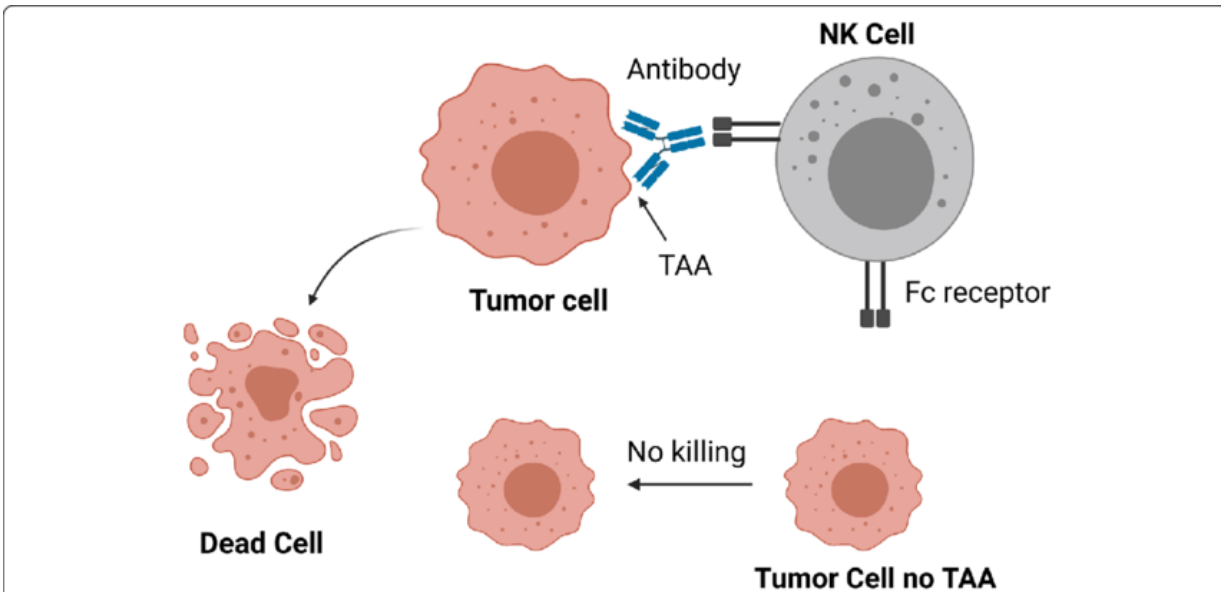

Figura 24. Citotossicità cellulare mediata da anticorpi esercitata da una cellula NK su una cellula tumorale (201)**.** Riprodotto su licenza CC BY 4.0.

Sistema del complemento

Il sistema del complemento è un insieme di proteine solubili e di membrana che interagiscono in maniera coordinata tra loro e con altre molecole del sistema immunitario (1). Le proteine solubili del complemento, chiamate componenti, si trovano costitutivamente nel plasma in forma di zimogeni, ossia precursori inattivi di enzimi. In particolari situazioni, le componenti vengono attivate, generando i prodotti che mediano le funzioni effettrici del complemento. L'attivazione del complemento si svolge secondo una cascata, analoga a quella che si verifica nella coagulazione: si hanno eventi sequenziali di proteolisi che convertono le componenti dalla forma zimogena a quella cataliticamente attiva. Le cascate enzimatiche presentano un effetto di amplificazione, poiché ogni singola unità attivata di enzima è capace di azionare un grande numero di altri enzimi a valle. In fase fluida, i prodotti attivi del complemento possono esistere solo transitoriamente; affinché l'attivazione si consolidi, occorre che essi si leghino covalentemente agli antigeni o agli anticorpi ad essi adesi. Questo aspetto garantisce che la risposta del complemento avvenga esclusivamente a livello della membrana dei microrganismi e delle regioni degli antigeni ove gli anticorpi si àncorino. Le cellule normali dell'ospite esprimono inoltre proteine di membrana che inibiscono l'attivazione del complemento, risultando dunque protette dai suoi effetti. I microbi, non essendo dotati di proteine regolatrici, permettono invece la piena attivazione del complemento sulla loro membrana. Esistono tre distinte vie di attivazione del complemento, note come classica, alternativa e lectinica. La via classica si origina da alcune classi di anticorpi a seguito del legame all'antigene, e rappresenta pertanto un meccanismo effettore dell'immunità umorale. La via alternativa è scatenata direttamente da componenti della parete microbica, senza coinvolgimento anticorpale. La via lectinica scaturisce dal legame della proteina sierica MBL (*Mannose-Binding Lectin*, lectina legante il mannosio) a residui terminali di mannosio che caratterizzano polisaccaridi e glicoproteine microbici, ma che sono invece assenti in quelli dei mammiferi. Le vie alternativa e lectinica rientrano nell'immunità innata. Tutte le vie del complemento generano complessi enzimatici il cui ruolo è il taglio proteolitico della componente C3, che rappresenta l'evento centrale dell'attivazione del complemento. Tutti i

processi mediati dal complemento sono dipendenti dalla proteolisi di C3. Anche il già menzionato frammento C3d, che funge da secondo segnale per l'attivazione dei linfociti B, è infatti un derivato di C3 (1).

Via classica del complemento e lisi cellulare mediata dal complemento

Ad innescare la via classica è il legame della componente C1 ad anticorpi fissati all'antigene (1). In particolare, C1 si associa ai domini CH2 delle IgG o ai domini CH3 delle IgM. Nell'uomo le sottoclassi di IgG più inclini ad attivare il complemento sono le IgG1 e le IgG3. C1q è un complesso costituito dalle subunità catalitiche C1r e C1s e dalla subunità C1q, che media l'interazione con le Ig. C1q è formata da sei catene organizzate in una struttura raggiata, quasi "ad ombrello". Ognuna di queste catene è organizzata in una porzione globulare che si continua con un'asta di composizione simile al collagene. Ciascuna testa globulare media il legame con un singolo frammento Fc. C1q è deputata al riconoscimento degli anticorpi, interagendo specificamente con le catene mu e alcune catene γ. Perché C1q possa attivarsi, essa deve legare almeno due frammenti Fc di immunoglobuline, e ogni Ig possiede un solo sito di legame a C1q nel proprio Fc. Queste peculiarità garantiscono che soltanto gli anticorpi complessati ad un antigene, e non quelli liberi nel plasma, possano determinare l'attivazione di C1q. Le IgG, essendo monomeriche, sono dotate di un solo frammento Fc; ne consegue che esse possano attivare il complemento solo qualora si ancorassero ad un antigene multivalente, assumendo una distribuzione spaziale che permetta l'associazione di C1q a più frammenti Fc. Nonostante le IgM libere nel plasma siano pentameriche, esse non concedono l'attivazione del complemento attraverso la via classica, poiché C1q non ha accesso ai 5 frammenti Fc del pentamero. A causa del legame all'antigene, tuttavia, si verifica un cambiamento conformazionale che espone le porzioni Fc, rendendone possibile l'associazione con C1q. La struttura pentamerica delle IgM, riuscendo ad impegnare più di una testa di C1q con una singola unità, rende questi anticorpi più efficienti nell'attivazione del complemento rispetto alle IgG. Le proteasi seriniche C1r e C1s sono arrangiate nel complesso C1 in forma di tetramero, a sua volta composto da due dimeri di ciascuna delle due subunità. L'interazione di due o più porzioni globulari di C1q con le IgG o le IgM aziona C1r, il quale attiva per proteolisi C1s. A tal punto, C1s agisce sulla componente C4 originando i frammenti C4b e C4a. C4a, di minori dimensioni rispetto a C4b, rimane nella fase fluida. C4 contiene un ponte tioestereo che alla proteolisi rimane confinato nel frammento C4b. Con la scissione di C4, tale ponte si destabilizza notevolmente e conferisce a C4b la spiccata capacità di formare un legame ammidico o estereo con l'anticorpo o con l'antigene a cui esso è adeso. Il legame covalente che si instaura garantisce che i fenomeni del complemento rimangano fisicamente circoscritti alla superficie della cellula o all'immunocomplesso. Avvenuto tale legame, la componente C2 si associa a C4b e viene scissa da C1s in C2a, che ritorna alla fase fluida, e in C2b, più grande, che resta associato a C4b. Il complesso C4b2b è chiamato C3 convertasi della via classica, e il suo ruolo è quello di scindere la componente C3. C4b media il legame di C3 alla convertasi, mentre C2b espleta l'attività proteolitica che genera i due frammenti C3b e C3a, di cui quest'ultimo più piccolo. C3 è omologa a C4, e C3b, al pari di C4b, è dotato di un ponte tioesterico instabile. C3b può idrolizzarsi oppure legarsi covalentemente alla superficie cellulare o all'anticorpo che ha scatenato la reazione. Una volta instauratasi l'interazione, C3b può dare luogo alla C3 convertasi della via alternativa, che amplifica notevolmente la proteolisi di C3. C3b può peraltro aggregarsi alla C3 convertasi della via classica, costituendo la C5 convertasi della via classica. Le C5 convertasi scindono la componente C5 nei frammenti C5a, che si diffonde in fase fluida, e C5b, che rimane associato alla superficie della

cellula. A livello di tale sede, C5b recluta, con un processo di tipo sequenziale, le componenti C6, C7, C8 e C9 a costituire il complesso di attacco alla membrana (MAC, *Membrane Attack Complex*). In modo del tutto analogo alla perforina, il MAC forma un poro sulla membrana cellulare. La comparsa di tali canali conduce la cellula a morte sia per la massiva entrata di acqua, la quale promuove la lisi osmotica della cellula, sia per l'innesco di apoptosi causato dall'innalzamento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} (1).

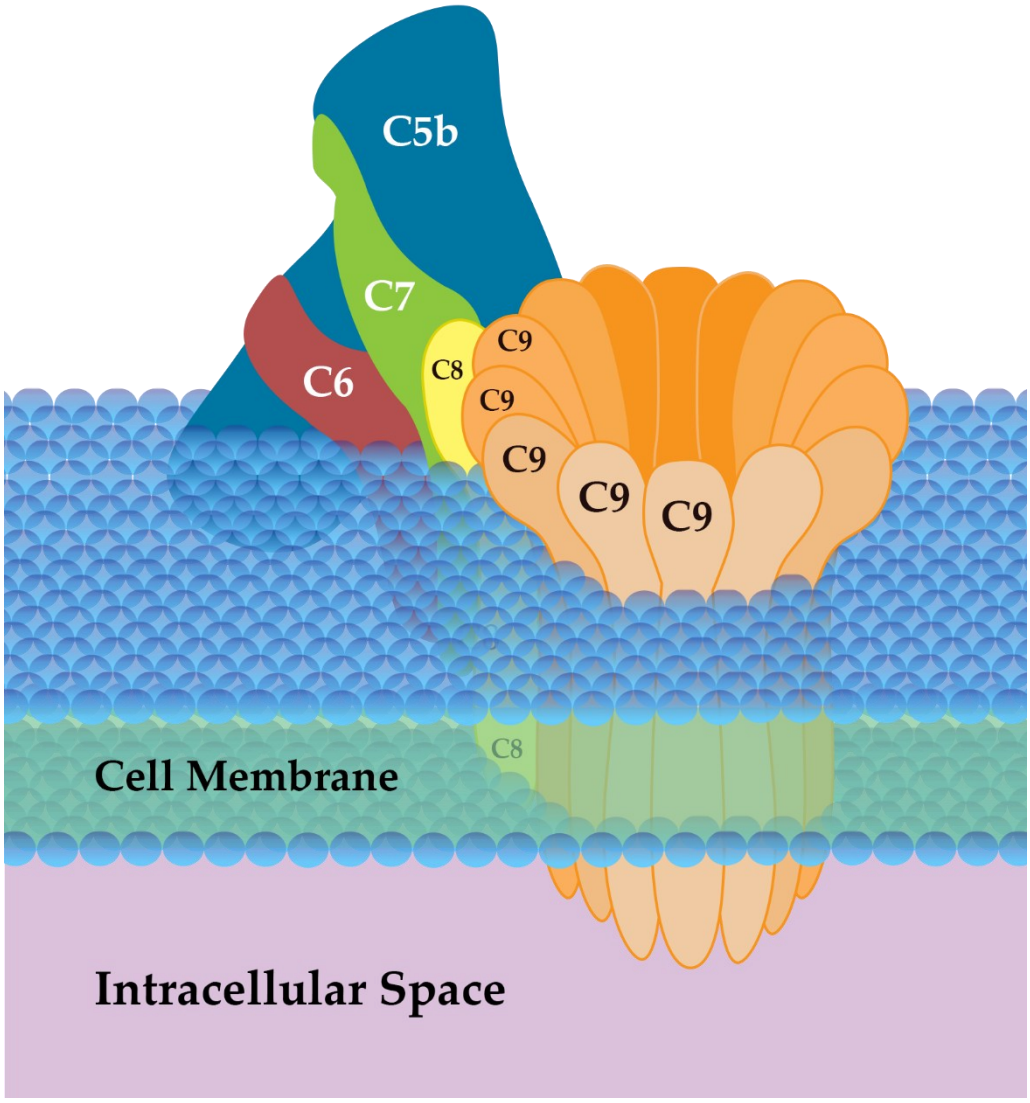

Figura 25. Schema tridimensionale del MAC (*Membrane Attack Complex*) (202)**.** Si noti la disposizione delle diverse componenti del complemento all'interno del complesso. Riprodotto su licenza CC BY-SA 3.0.

Fagocitosi mediata dal complemento

Oltre ad espletare la lisi delle cellule che lo inducono, il sistema del complemento è un importante promotore della fagocitosi (1). Quando un microrganismo innesca la via classica o la via alternativa, esso viene ricoperto dai frammenti C4b, C3b, e da un prodotto della proteolisi di quest'ultimo, chiamato C3bi. Tali opsonine mediano la fagocitosi interagendo con i recettori del complemento espressi da macrofagi e neutrofili. Il complemento assume un ruolo fondamentale nella fagocitosi di batteri dotati di capsula polisaccaridica, come gli

pneumococchi: le IgM dirette contro i polisaccaridi capsulari legano tali microrganismi e attivano la via classica del complemento. In tal modo, questi batteri possono essere fagocitati dai macrofagi all'interno della milza (1).

Anafilotossine

I frammenti C3a, C4a e C5a del complemento agiscono su recettori di membrana espressi su mastociti e neutrofili scatenando un processo infiammatorio acuto (1). C5a è attivo in tal senso anche sulle cellule endoteliali. Tali peptidi sono noti come anafilotossine poiché inducono la degranulazione dei mastociti e la conseguente liberazione dei mediatori di anafilassi, tra cui l'istamina (1).

Aspetti anatomopatologici della cascata complementare a carico di immunocomplessi

L'attivazione del complemento a livello di un immunocomplesso ne favorisce la fagocitosi, ma ha anche altre implicazioni fisiopatologiche di rilievo (1). Quando la risposta umorale si sviluppa, potrebbero generarsi immunocomplessi circolanti. Qualora essi si trovassero in quantità sufficientemente elevate e dimensioni ideali, potrebbero dar luogo ad aggregati a livello delle pareti vasali, con conseguenti reazioni infiammatorie e danni tissutali. È questa la patogenesi delle reazioni da ipersensibilità di tipo III, ovvero da immunocomplessi. La precipitazione di tali depositi potrebbe essere governata, oltre che dai legami Ig-antigene, anche da interazioni non covalenti tra frammenti Fc di anticorpi. L'intervento del complemento in questi casi può ostacolare l'ampliamento degli immunocomplessi e favorire la loro dissociazione (1).

Immunità anticorpale mucosale

Come esposto anteriormente, le mucose sono distretti molto peculiari dal punto di vista immunitario (1). I linfociti T intraepiteliali, pur essendo dislocati nello spessore delle mucose, non possono accedere al lume degli organi. La difesa dai microrganismi che transitano nel lume dei sistemi gastrointestinale, respiratorio, genitale e urinario è dunque affidata all'immunità umorale, non potendo essere mediata da cellule. Le IgA rappresentano il prevalente isotipo anticorpale prodotto dai tessuti linfoidi associati alle mucose (MALT). Si stima che la produzione di IgA in un adulto di 70 kg sia ammonti circa 2 grammi al giorno, pari a circa il 60-70% della sintesi anticorpale giornaliera complessiva. Ciononostante, le IgA rappresentano meno del 25% degli anticorpi circolanti nel plasma. Tale scarsità di IgA nel plasma è dovuta alla loro sede di produzione, in larga parte confinata ai tessuti linfoidi associati alle mucose, e alla grande efficienza con cui vengono trasportate nel lume degli organi che ospitano questi tessuti. Le IgA sono trasportate nelle secrezioni mucose, ove legano microrganismi e le tossine da essi prodotte con la conseguente neutralizzazione degli stessi. Le risposte umorali che conseguono all'ingresso degli antigeni per ingestione e per via aerea sono costituite per la maggior parte da IgA. D'altra parte, la protezione fornita dalle vaccinazioni somministrate per via orale consiste principalmente nell'immunità mucosale. Lo scambio isotipico verso le IgA nei linfociti B stimolati dall'antigene è mediato dal TGF-β, secreto dai linfociti T e da cellule stromali, e dall'IL-5, prodotta dalle cellule Th2. Le cellule B

localizzate nella lamina propria della mucosa secernono le IgA in forma dimerica. Il trasporto delle IgA attraverso la mucosa nel lume è mediato dal recettore poli-Ig, espresso sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali, il quale lega il frammento Fc delle IgA. Il recettore poli-Ig è una glicoproteina di membrana comprendente 5 domini Ig extracellulari. A livello basolaterale, le IgA dimeriche si associano al recettore poli-Ig. Il risultante complesso subisce endocitosi ed è trasportato mediante una vescicola verso la regione apicale della cellula mucosale. Ivi giunta, la vescicola si fonde con la membrana apicale. In tale sede, il recettore subisce un taglio proteolitico enzimatico, cosicché i domini transmembrana e intracellulare rimangono ancorati alla cellula, mentre la porzione extracellulare, detta componente secretoria, rimane legata all'IgA liberata nelle secrezioni. Il recettore poli-Ig media il trasporto transmucosale delle IgA dimeriche non solo nelle secrezioni gastrointestinali e bronchiali, ma anche nella bile, nella saliva e nel latte. Questo recettore attua il trasferimento delle secrezioni anche delle IgM. Si ricordi, a tal proposito, che sia le IgM, esistenti in forma pentamerica, sia le IgA dimeriche sono entrambe associate alla catena J (1).

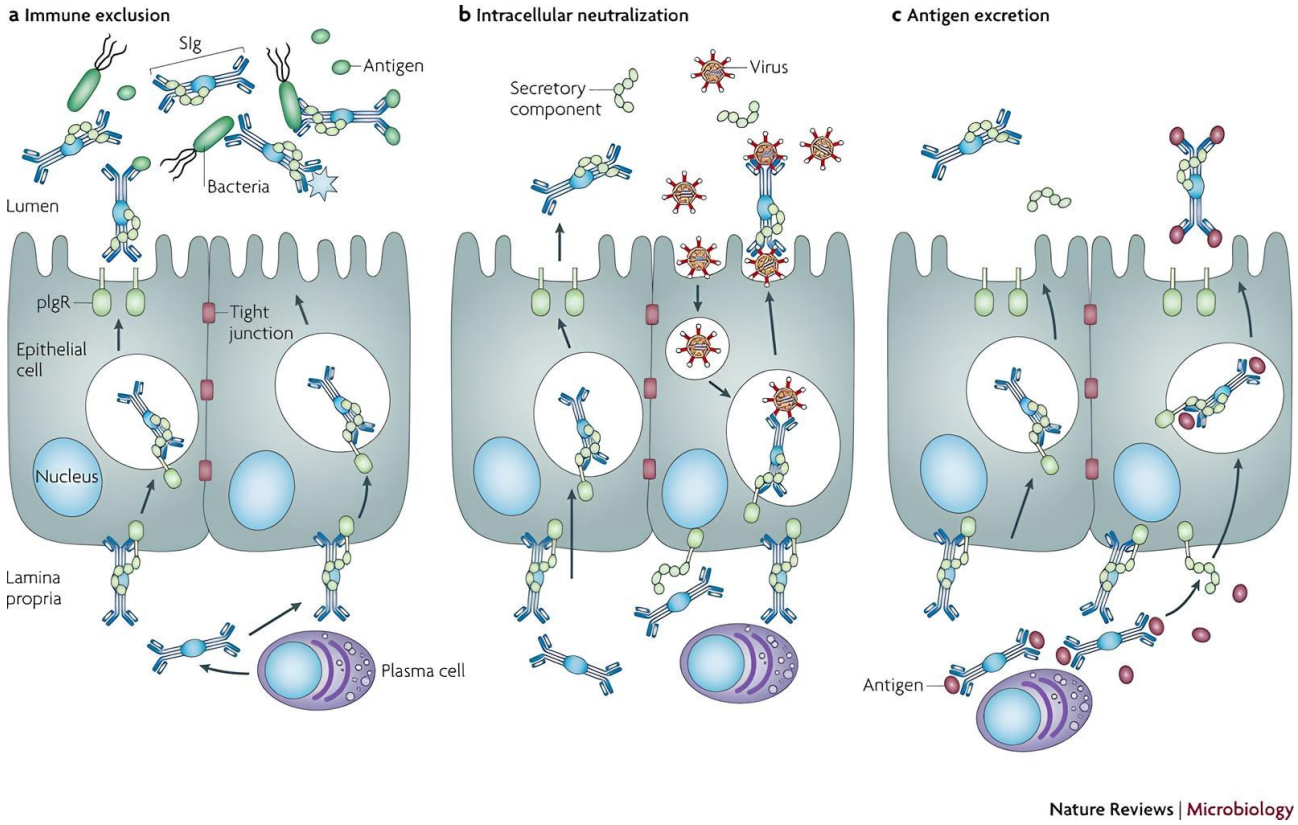

Figura 26. Immunità anticorpale mucosale (203)**.** Si osservino il ruolo del recettore poli-Ig (**pIgR**) nel trasporto delle IgA dalla lamina propria al lume dell'organo e i diversi meccanismi mediante i quali le IgA proteggono il distretto dai microrganismi patogeni.

Immunità transplacentare e neonatale

I neonati presentano un'immaturità del sistema immunitario che li rende incapaci di esercitare risposte efficaci contro i microrganismi patogeni (204). In questa delicata fase della vita, le difese immunitarie sono prevalentemente relegate all'immunità passiva garantita dagli anticorpi materni. Durante la vita fetale, anticorpi contenuti nel siero della madre vengono trasportati attraverso la placenta. Le IgG sono l'unico isotipo anticorpale in grado di subire un

significativo trasporto transplacentare. Il passaggio di tutte le sostanze dal sangue materno a quello fetale prevede, sequenzialmente, l'attraversamento del sinciziotrofoblasto, costituito da cellule multinucleate, del tessuto stromale dei villi coriali, e delle cellule endoteliali fetali. Il trasporto è effettuato dal recettore Fc neonatale (FcRn). FcRn è strutturalmente correlato alla molecola MHC di classe I, con la quale condivide una certa omologia. Come questa, infatti, è costituito da una glicoproteina integrale di membrana, chiamate catena α, associata non covalentemente ad una unità di β2-microglobulina (204). FcRn non è in grado di legare le IgG a pH fisiologico. Tale interazione può instaurarsi solo a pH acido. La membrana apicale delle cellule del sinciziotrofoblasto internalizza le IgG per pinocitosi, ed è all'interno degli endosomi che gli anticorpi si legano a FcRn, grazie al raggiungimento del pH ottimale in tale sede. Le vescicole trasportano le IgG al dominio basolaterale delle cellule del sinciziotrofoblasto, ove si fondono con la membrana. A tal punto, gli anticorpi si dissociano da FcRn a causa del pH fisiologico del tessuto stromale (173). Si ritiene che i fibroblasti e le cellule di Hofbauer residenti nello stroma dei villi coriali possano legare e intrappolare immunocomplessi (204,205). Il trasporto transplacentare delle IgG ha inizio solo alla tredicesima settimana di gestazione, ed è caratterizzato da un progressivo aumento durante la gravidanza (204). Ciò accade poiché nelle prime fasi della gravidanza il citotrofoblasto ricopre uno strato discontinuo di sinciziotrofoblasto. Il citotrofoblasto, non esprimendo FcRn, forma una barriera al trasporto anticorpale (206,207). Successivamente, le cellule del citotrofoblasto si differenziano in sinciziotrofoblasto, e quest'ultimo incrementa gradualmente la sua area di superficie (207). Mentre l'espressione di FcRn nelle cellule del sinciziotrofoblasto è un fenomeno pienamente acclarato (208), sulla presenza di tale recettore anche nell'endotelio dei capillari fetali della placenta i dati sono contrastanti (209). A tal proposito, si menziona uno studio del 2019 effettuato su placente di parti a termine, in cui si rilevava l'espressione di FcRn a livello della vascolarizzazione placentare, in particolare nelle cellule endoteliali arteriose e venose (210). Si riscontrava FcRn nelle cellule endoteliali dei capillari fetali a fenotipo $CD31^+$ sia a livello dei villi ancoranti che dei villi terminali. Questi risultati potrebbero suggerire un ruolo di FcRn nella transcitosi delle IgG dallo stroma dei villi al sangue fetale (210). Grazie al trasporto transplacentare di IgG, il neonato a termine possiede, nel proprio siero, lo stesso repertorio anticorpale della madre (204). Il trasferimento di anticorpi durante la gravidanza può risultare compromesso da numerose condizioni patologiche materne (204). Uno studio svolto in Kenya nel 2007 ha analizzato i livelli sierici di IgG antitetano in neonati di madri che avevano ricevuto il vaccino a tossoide tetanico (211). I discendenti di madri affette da malaria placentare e quelli di donne sieropositive all'HIV presentavano livelli di anticorpi antitetano ben inferiori rispetto ai nati da madri sane (211). Il latte materno contiene anticorpi di tutti gli isotipi, ovvero IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, con un'ampia predominanza di IgA (212). Gli anticorpi ingeriti con il latte possono neutralizzare microrganismi patogeni e tossine da essi prodotte nel lume gastrointestinale, impedendone l'adesione alle mucose (1). Le IgG sono inoltre soggette ad un trasporto dal lume intestinale al siero, che avviene mediante transcitosi mediata da FcRn (1). Il recettore FcRn è espresso in molti tessuti umani anche nell'adulto, ove è possibile che protegga le IgG dal catabolismo aumentandone quindi l'emivita (213). Si è notato che, nelle cellule endoteliali, FcRn media la transcitosi e il riciclo delle IgG *in vitro* (214). L'espressione di FcRn è stata accertata negli enterociti del feto e dell'adulto (215,216), nei monociti, nelle cellule dendritiche e nei macrofagi della lamina propria dell'intestino tenue (217). FcRn è stato identificato anche negli epatociti del topo (218).

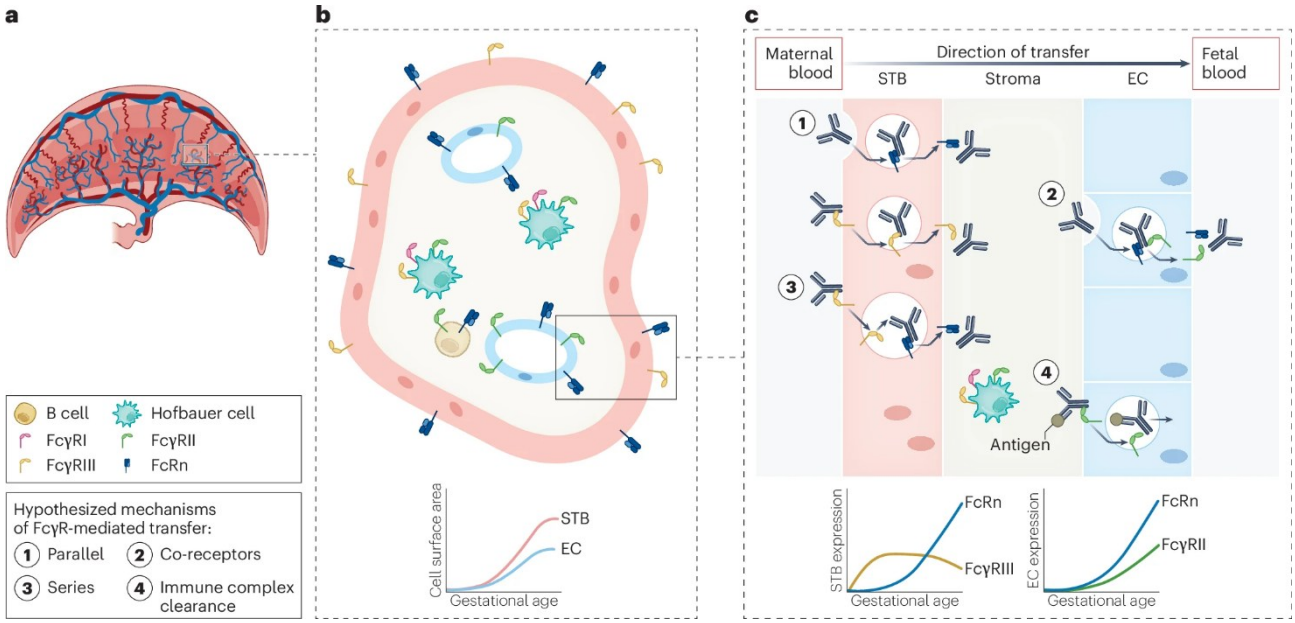

Figura 27. Trasporto transplacentare degli anticorpi (207)**.** (**a**) Anatomia macroscopica normale della placenta umana, con i villi coriali e gli spazi intervillosi. (**b**) Sezione di un villo coriale, con il sinciziotrofoblasto, disposto esteriormente, e i capillari fetali, tra loro separati dallo stroma del villo, il quale contiene le cellule di Hofbauer. (**c**) Processo di trasporto degli anticorpi attraverso il sinciziotrofoblasto, lo stroma del villo e le cellule endoteliali fetali, con l'intervento dei recettori FcγRII, FcγRIII e FcRn.

INFLUENZA

L'influenza è una malattia infettiva altamente contagiosa che nell'uomo è causata dai virus *Alphainfluenzavirus influenzae*, *Betainfluenzavirus influenzae* e *Gammainfluenzavirus influenzae*. Si può presentare come un'infezione del tratto respiratorio superiore oppure dare origine a complicazioni come polmoniti potenzialmente letali, dovute allo stesso virus o a superinfezioni batteriche delle vie respiratorie inferiori.

Classificazione dei virus influenzali

I virus influenzali appartengono alla famiglia degli *Orthomyxoviridae* (219). Esistono quattro distinti virus influenzali, rispettivamente chiamati *Alphainfluenzavirus influenzae* (virus dell'influenza A), *Betainfluenzavirus influenzae* (virus dell'influenza B), *Gammainfluenzavirus influenzae* (virus dell'influenza C) e *Deltainfluenzavirus influenzae* (virus dell'influenza D). Il virus dell'influenza A infetta molte specie di mammiferi, tra cui l'uomo, il cane, il cavallo e il suino, e di uccelli, tra cui il pollo, il papero e il tacchino. Il virus dell'influenza B colpisce l'uomo e i pinnipedi. Il virus dell'influenza C contagia l'uomo e i suini, mentre il virus dell'influenza D, pur infettando altre specie animali, non ha finora dimostrato di poter contagiare l'uomo (219).

Virus dell'influenza A: struttura e aspetti biochimici

Il virus dell'influenza A è un virus a RNA dotato di pericapside. Il suo patrimonio genetico è organizzato in 8 frammenti di RNA a singolo filamento a polarità negativa, più in breve, (-

)ssRNA. Il pericapside è provvisto di due glicoproteine, l'emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA), ed è al contempo attraversato dalla proteina transmembrana M2. L'HA è dotata di un dominio a "stelo", più prossimale rispetto alla membrana, e di uno a "testa", dalla forma convessa, pressoché a cuneo. Al di sotto della membrana pericapsidica risiede la matrice, uno strato la cui architettura è costituita da unità della proteina M1. All'interno del virione, ciascuno degli 8 frammenti di RNA virale (vRNA) risiede nel capside in forma di particella ribonucleoproteica (vRNP, *viralRiboNucleoProtein*), in cui il vRNA è complessato con nucleoproteine (NP) ed è associato alla polimerasi eterotrimerica PB1/PB2/PA. Le 8 porzioni di vRNA sono soggette a meccanismi di *splicing* alternativo, cosicché le proteine che il virus sintetizza sono complessivamente in numero maggiore di 8. Le 10 proteine essenziali per l'infezione sono PB1, PB2, PA, NP, HA, NA, M1, M2, NS1 e NEP/NS2, mentre le proteine accessorie, tra cui PB1-F2 e PA-X, mediano le interazioni tra virus e ospite e modulano l'immunità innata, influenzando la patogenicità del virus. Nell'ambito del complesso polimerasico PB1/PB2/PA, indispensabile per la sintesi del vRNA, PB1 possiede un dominio RNA polimerasico RNA-dipendente, PB2 contiene un dominio *cap-binding*, mentre PA mostra attività endonucleasica (219).

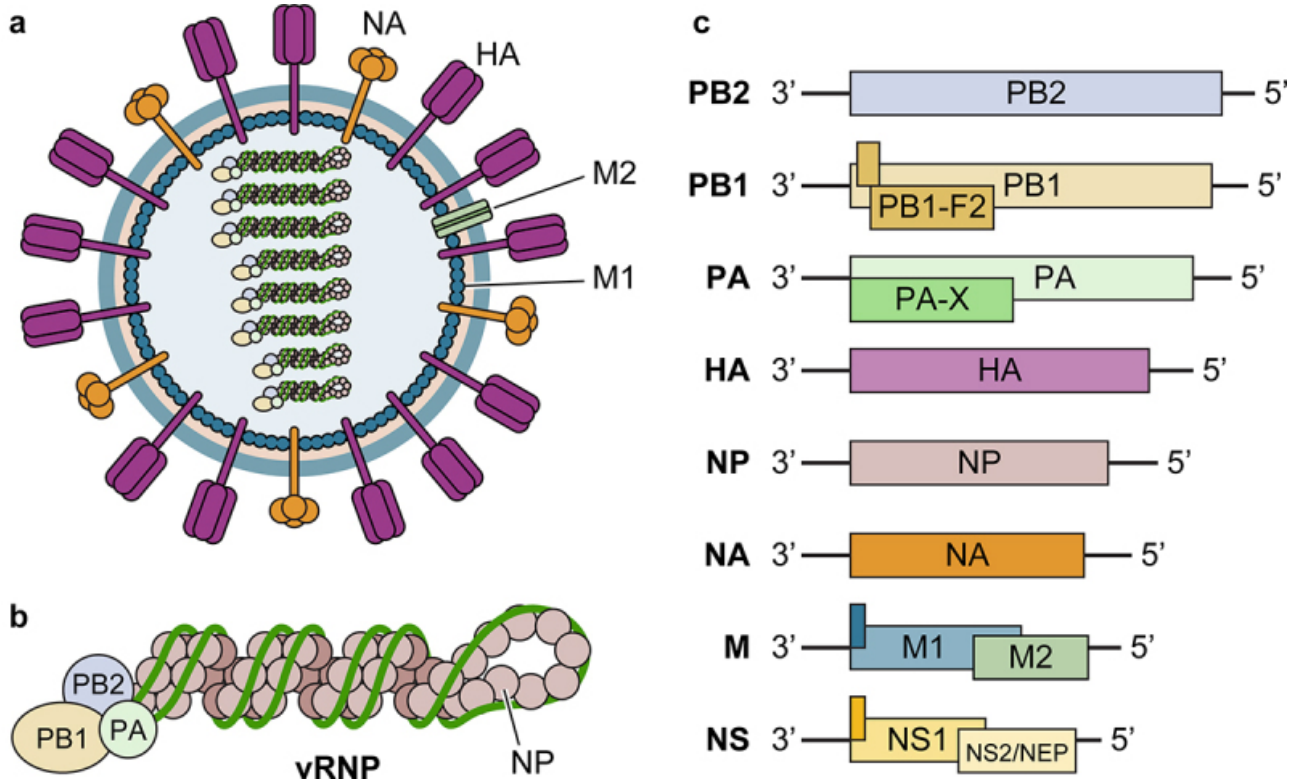

Figura 28. Illustrazione delle componenti del virus dell'influenza A (219)**. a**) Virione. **b**) Struttura molecolare dei complessi vRNP. **c**) Schema dei segmenti di RNA virale; i trascritti che si ottengono mediante *splicing* alternativo o *frameshifting* sono rappresentati con barre colorate parzialmente sovrapposte tra loro.

Nomenclatura dei virus influenzali

Si riconoscono diversi sottotipi del virus dell'influenza A, definiti sulla base del sottotipo di HA e NA che il virus espone (220). Sono stati finora identificati 18 tipi di HA, numerati da H1 a H18, e 11 tipi di NA, classificati da N1 a N11. Ogni singolo isolato di un virus influenzale è classificato secondo una distintiva nomenclatura. Tale codice indica, nel seguente ordine, la

specie del virus, ossia A, B, C, o D, la specie dalla quale il virus è stato isolato, il luogo geografico di isolamento, il numero di isolato e l'anno di isolamento. Nel caso di virus isolati dall'uomo, il dato sulla specie è omesso. Solo per i virus dell'influenza A, dopo tutti i dati elencati è fornita, tra parentesi, la classificazione secondo i sottotipi di HA e NA (220). Segue ora un esempio: A/Turkey/Italy/214845/2002(H7N3). In questo nome, "Turkey" rappresenta la specie di isolamento, ossia il tacchino.

Ciclo vitale del virus dell'influenza A

Il ciclo vitale del virus dell'influenza A si apre con il legame dell'HA al suo recettore, il quale è costituito dai residui di acido sialico di glicoproteine e glicolipidi di membrana delle cellule dell'epitelio respiratorio (219). A mediare tale interazione è una peculiare regione dell'HA, nota come sito legante il recettore. Il virione viene in tal modo internalizzato in un endosoma precoce e procede verso un endosoma tardivo. Il marcato abbassamento del pH che si verifica nell'endosoma tardivo produce un cambio conformazionale dell'HA. In tal modo, l'HA espone un peptide di fusione che innesca la fusione del pericapside virale con la membrana endosomiale. Contemporaneamente, la proteina M2 opera il trasporto di ioni H^+ dall'esterno all'interno della particella virale. La conseguente diminuzione del pH interno del virione favorisce il rilascio dei complessi vRNP dalla matrice virale al citoplasma, in un processo noto come *uncoating*. I complessi vRNP si trasferiscono quindi nel nucleo, laddove l'RNA polimerasi virale PB1/PB2/PA produce un RNA complementare a polarità positiva (cRNA) per ognuno degli 8 frammenti di vRNA, da poter usare per la replicazione di nuovo vRNA, e genera al contempo mRNA per la sintesi delle proteine virali. Per la produzione di mRNA, la polimerasi virale sequestra il cappuccio in 5' di un pre-mRNA dell'ospite mediante un meccanismo di *cap-snatching*: PB2 si lega al cappuccio del pre-mRNA cellulare, e l'endonucleasi PA lo taglia dal resto del costrutto. La sintesi dell'mRNA virale inizia a partire da tale cappuccio in 5'. Il trascritto ottenuto viene inoltre corredato di una coda poliadenilata in 3'. Solo alcuni dei trascritti primitivi vanno incontro a *splicing* alternativo. Tra questi vi è M, adattato per codificare rispettivamente le proteine M1 e M2. Dopo le eventuali modifiche, i trascritti sono esportati dal nucleo al citoplasma affinché essi possano essere tradotti dai ribosomi. Una volta generate, le proteine PB1, PB2, PA e NP vengono importate nel nucleo al fine di amplificare la replicazione del vRNA e permettere l'assembleggio dei vRNP. Le proteine di membrana neosintetizzate, ossia HA, NA e M2, sono convogliate dal reticolo endoplasmatico alla membrana cellulare dall'apparato di Golgi. I vRNP fuoriescono dal nucleo con l'ausilio delle proteine M1 e NEP/NS2, e si trasferiscono alla membrana per l'assemblaggio del virione. In quest'ambito, la proteina M1 interagisce con le proteine di membrana e con i vRNP favorendo l'assemblaggio e il rilascio delle particelle virali. I vRNP si dispongono nel virus in una configurazione "1+7", in cui un vRNP si dispone al centro e gli altri 7 lo circondano (219). Tale orientamento spaziale è essenziale per l'architettura del virione: virus dell'influenza A mancanti di un segmento di RNA determinano una progenie che include i 7 vRNP con l'aggiunta di un rRNA cellulare a completarne la struttura (221). Le particelle virali neoformate producono aggregati sulla superficie cellulare poiché l'HA si lega ai residui di acido sialico presenti sulla cellula e sui virioni. Il distacco e la diffusione extracellulare dei virioni sono garantiti dalla NA, che dissolve tale interazione (219).

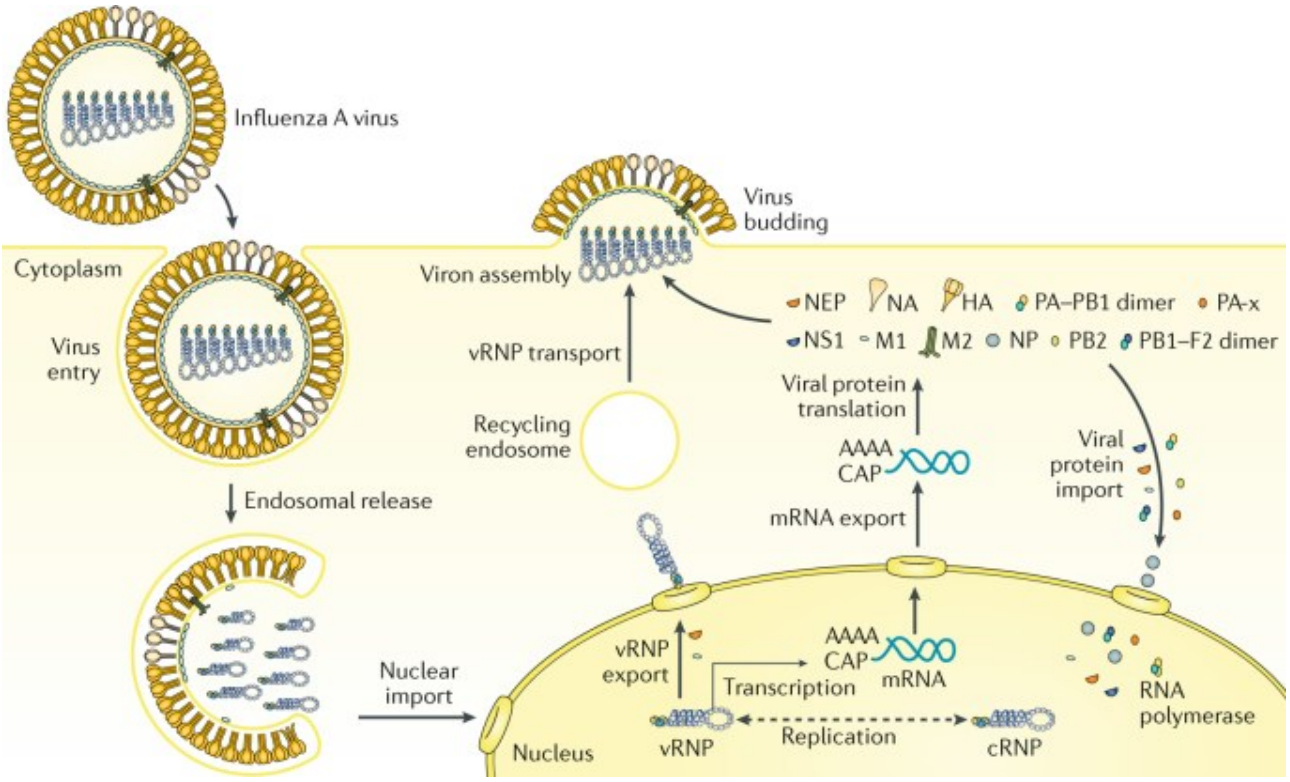

Figura 29. Ciclo vitale del virus dell'influenza A (220).

Patogenesi dell'influenza

L'immunità innata rappresenta un ostacolo per aggirare il quale il virus dell'influenza A ha sviluppato alcuni meccanismi biochimici e molecolari (220). NS1 è una proteina virale in grado di legarsi all'RNA virale, impedendo a quest'ultimo di essere riconosciuto dal recettore dell'immunità innata RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene I*) (222). NS1 interagisce inoltre con le proteine TRIM-21 e Riplet, inibendo l'ubiquitinazione di RIG-I (223). Mediante questi meccanismi, NS1 sopprime l'espressione di interferoni indotta da RIG-I (223). Inoltre, NS1 ostacola la produzione di citochine antivirali interferendo con la processazione dell'estremità in 3' dei pre-mRNA cellulari, ma non di quelli virali, di fatto sequestrando i trascritti primari cellulari nel nucleo (224). NS1 inibisce anche direttamente il trasporto citoplasmatico dell'mRNA agendo sul macchinario di esportazione e sul complesso del poro nucleare (225). PA-x, derivata dal *frameshift* del frammento codificante PA, ha un effetto deterrente sull'espressione genica cellulare a causa della sua attività RNA endonucleasica (226). Gli interferoni di tipo I e III, la cui espressione è indotta dalla via di segnalazione RIG-I/MAVS, ostacolano l'infezione virale nelle cellule epiteliali mediante l'innesco di due circuiti di amplificazione ridondanti e parzialmente sovrapposti tra loro ai fini dell'induzione di geni antivirali (227). Per l'efficiente sviluppo di linfociti T $CD8^+$ della memoria e per lo scambio isotipico degli anticorpi specifici per il virus è necessario il contributo delle cellule T $CD4^+$ (228,229). In tale contesto, i linfociti T $CD4^+$ interagiscono con le cellule B e T $CD8^+$ attraverso meccanismi sinergistici, additivi o ridondanti (229). La risposta dei linfociti B ha un'importanza notevole sia nell'infezione dal virus dell'influenza A sia nella formazione dell'immunità a seguito di vaccinazione (220). Gli anticorpi prodotti sono diretti prevalentemente contro le proteine HA e NA, e in minor parte anche contro le proteine di matrice (230). Gli anticorpi specifici per l'HA sembrano legarsi preferenzialmente a determinati siti della testa della

proteina (231). Nonostante ciò, la testa dell'HA e la proteina NS1 sono caratterizzate da grande plasticità, mutando rapidamente con il *drift* antigenico (232). Parallelamente, si verifica anche una generazione di anticorpi verso epitopi ben più conservati (233), tra cui taluni epitopi dello stelo dell'HA (234), della NA (235,236), e del dominio extracellulare di M2 (237). Essendo le mucose la sede di attecchimento del virus, l'immunità mucosale ricopre un ruolo indispensabile per prevenire lo sviluppo della malattia. Nel caso dell'uomo, tale funzione è riferita alla mucosa del tratto respiratorio (220). L'immunità mucosale previene anche la trasmissione del virus in modelli animali (238,239). Tra le cellule dendritiche convenzionali presenti nei linfonodi drenanti il polmone si distinguono cellule residenti e altre migratorie, ossia derivate dai tessuti (240). Ben evidente è il ruolo delle cellule dendritiche migratorie nella presentazione degli antigeni del virus dell'influenza A ai linfociti T nei linfonodi drenanti il polmone (241–244). Sono riconosciute due sottopopolazioni di cellule migratorie, identificate sulla base del marcatore CD103 e del CD11b (245). Le cellule dendritiche a fenotipo $CD103^+$, le quali captano il virus dell'influenza A mediante fagocitosi di cellule infette, risultano protette dal virus. Esse migrano ai linfonodi drenanti e cross-presentano l'antigene ai linfociti T $CD8^+$ (243). Uno studio precedente attribuisce invece la presentazione del virus tramite MHC I ai linfociti T $CD8^+$ alle cellule dendritiche $CD11b^+$ (244). Altri studi riconducono l'attivazione delle cellule T $CD8^+$ ad entrambe queste sottopopolazioni di cellule dendritiche (246,247). Essendo stato provato che le cellule dendritiche sono capaci di fagocitare monociti infettati dal virus dell'influenza A e di attivare susseguentemente i linfociti T $CD8^+$ (248), è possibile che le cellule dendritiche acquisiscano gli antigeni virali per attivare i linfociti T citotossici mediante fagocitosi di cellule epiteliali respiratorie (240). I linfociti T citotossici eliminano il virus dal polmone mediante l'azione della perforina e l'innesco della via di Fas/FasL (249). I linfociti T $CD8^+$ attivati continuano a proliferare anche nel polmone (250), grazie alle cellule dendritiche che sono reclutate nel tessuto polmonare nel corso dell'infezione da virus dell'influenza A (251).

Virus dell'influenza B e C

Il virus dell'influenza B possiede anch'esso un genoma organizzato in 8 segmenti di (-)ssRNA, complessati a nucleoproteine (NP) e corredati del complesso polimerasico PB1/PB2/PA (220). Come il virus dell'influenza A, il virus dell'influenza B manifesta anche le proteine HA, NA e M1, le quali sostengono la medesima funzione. In luogo della proteina M2 del virus dell'influenza A, chiamata A/M2, il virus dell'influenza B presenta B/M2 (220). Pur essendo B/M2 una proteina transmembrana con il ruolo di canale protonico, analoga quindi ad A/M2 (252), essa deriva da un mRNA bicistronico per B/M1 e B/M2 (253), mentre A/M2 è ottenuta per *splicing* alternativo (219). Il virus dell'influenza B non produce le proteine PB1-F2 e PA-x, ma possiede NB, una proteina di superficie ancorata al pericapside non presente nel virus dell'influenza A (220). Il virus dell'influenza B si suddivide in due lignaggi, noti come B/Victoria/2/1987-like e B/Yamagata/16/1988-like, sulla base delle differenze antigeniche. Poiché questo virus ha una velocità di mutazione ben inferiore rispetto al virus dell'influenza A, e data inoltre la paucità di serbatoi animali, costituiti in prevalenza da suini e pinnipedi, il virus dell'influenza B non scatena pandemie (254). Il patrimonio genetico del virus dell'influenza C è arrangiato in 7 frammenti di RNA (220). L'uomo è il principale serbatoio di questo microrganismo, anche se il virus dell'influenza C può occasionalmente infettare suini e cani (254). Il virus dell'influenza C sostiene generalmente malattie di lieve entità nell'uomo (220). Nei bambini, tuttavia, tale virus può provocare a infezioni del tratto respiratorio che

possono richiedere l'ospedalizzazione (255). Al contrario del virus dell'influenza A, ai virus dell'influenza B e C non è assegnata una classificazione in sottotipi (220).

Meccanismi genetici di evoluzione dei virus influenzali

L'evoluzione dei virus influenzali è pilotata da due fondamentali fenomeni, rispettivamente noti come *shift* antigenico e *drift* antigenico (219). Il *drift* antigenico consiste in mutazioni degli epitopi delle proteine HA e NA a cui gli anticorpi si legano. Tali mutazioni compromettono il riconoscimento di tali epitopi da parte di anticorpi formati durante le infezioni da ceppi precedenti dei virus. Il *drift* antigenico dipende dall'accumulo di mutazioni nel genoma virale dovuto all'assenza dell'attività di *proofreading* da parte dell'RNA polimerasi virale RNA-dipendente. La responsabilità delle epidemie influenzali stagionali e della necessità del rinnovo annuale della vaccinazione ricade proprio sul *drift* antigenico. Alquanto più complesso è il fenomeno dello *shift* antigenico. Nell'ambito dei virus influenzali, lo *shift* antigenico comporta il riassortimento dei segmenti di RNA genomico di due diversi virus dell'influenza, con l'insorgenza di nuovi ceppi o sottotipi virali potenzialmente in grado di causare grave malattia. Allo *shift* antigenico sono dovuti gli eventi di zoonosi e le pandemie influenzali. Ad esempio, il virus influenzale pandemico del 1957 si originò dal riassortimento di un virus aviario H2N2 e di un virus umano H1N1, mentre il virus pandemico H1N1 del 2009 derivò da numerosi eventi di riassortimento virale nei suini (219). Affinché il riassortimento di materiale genetico tra due virus possa avvenire, i due virus devono infettare lo stesso ospite, lo stesso tessuto in tale ospite, e le medesime cellule in questo tessuto (256). All'interno della singola cellula, i frammenti di materiale genetico dei due virus si devono mescolare tra loro e venire infine incapsidati cosicché i virioni risultanti includano una miscela dei segmenti genomici dei virus originari. Esistono alcuni sostanziali ostacoli citologici e biochimici a questo processo. Uno di questi è la compartimentalizzazione della replicazione virale all'interno della cellula. Il ciclo vitale di alcuni virus prevede la collocazione dei processi biologici di replicazione dell'agente infettivo in ben delimitate aree della cellula, con le componenti virali confinate all'interno di vescicole e corpi di inclusione nucleari e citoplasmatici. Ciò potrebbe porre notevoli barriere fisiche al riassortimento di due virus. Un altro fattore deterrente è la reciproca compatibilità tra i vari segmenti genomici dei due virus. I frammenti di materiale genetico di virus diversi devono produrre interazioni favorevoli tra loro e con le proteine circostanti per potersi assemblare in una particella virale (256). La trasmissione inter-specie dei virus influenzali si verifica attraverso gli stessi meccanismi che controllano il *drift* antigenico: l'alto tasso di errore della RNA polimerasi può indurre mutazioni casualmente associate ad un adattamento della progenie virale ad un'altra specie (220).

Trasmissione dei virus influenzali tra animali e zoonosi

I virus H17N10 e H18N11 sono stati riscontrati esclusivamente nei pipistrelli (219). I sottotipi virali che comprendono le proteine da H1 a H16 e da N1 a N9 si riscontrano invece negli uccelli selvatici, come paperi e limicoli, e possono infettare anche uccelli domestici, di cui polli, tacchini e paperi domestici. Sottotipi del virus dell'influenza A si riscontrano anche in molti mammiferi marini e terrestri, e si ritiene che essi abbiano un'origine aviaria. L'influenza aviaria nel pollame è responsabile di effetti nefasti sull'allevamento (219). Uccelli migratori come oche e anatre selvatiche rappresentano il maggiore serbatoio di molti sottotipi del virus

dell'influenza A (220). La trasmissione del virus da questi uccelli al pollame sfrutta come intermediari le anatre domestiche allevate in stagni aperti. Il contagio del virus tra uccelli e da uccelli a mammiferi marini avviene per contatto con l'acqua contaminata o con fomiti. Le anatre domestiche trasmettono il virus al pollame nell'ambito di allevamenti per autoconsumo, ove molteplici specie avicole sono allevate congiuntamente, e di mercati di pollame vivo, in cui gli animali vengono promiscuamente assembrati. Anche in questi casi, il contagio avviene tramite l'acqua o fomiti. Da ultimo, il virus si diffonde dagli allevamenti domestici e dai mercati agli allevamenti intensivi (220). L'ampia diffusione del virus provocata dai mercati è favorita dalle carenti pratiche di biosicurezza e disinfezione (257). La trasmissione del virus all'uomo è possibile in tutte le fasi appena descritte, e può avvenire attraverso l'acqua, aerosol e fomiti (220). A seguito del contagio umano, tuttavia, la trasmissione interumana di virus aviari è piuttosto rara. Sono necessari taluni adattamenti aggiuntivi affinché il virus possa intraprendere in modo efficace la trasmissione interumana. Attraverso il pollame, le anatre domestiche, o talora direttamente mediante gli uccelli selvatici, mammiferi terrestri quali l'equino, il suino, il cane ed il gatto possono contrarre il virus dell'influenza A (220). Nel suino, l'influenza è provocata dai virus A H1N1, H1N2 e H3N2, e comporta manifestazioni cliniche simili a quelle umane, inclusa la polmonite (258). Per alcuni sottotipi virali, tra cui il virus pandemico del 2009 A H1N1pdm2009, è nota la trasmissione dall'uomo al suino e dal suino all'uomo mediante aerosol (259). Nel 2016 venne riportata un'epidemia del virus A H7N2 nei gatti a Manhattan, con un caso di trasmissione dal gatto all'uomo. La vittima era un veterinario che venne a contatto con secrezioni orofaringee di gatto, in assenza degli adeguati dispositivi di protezione (260). Nel corso dell'epidemia del virus aviario A H5N1 nel Sud-Est asiatico tra il 2003 e il 2004, due tigri (*Panthera tigris*) e due leopardi (*Panthera pardus*) dello zoo di Suphanburi, in Thailandia, morirono dopo aver manifestato severi sintomi influenzali (261). Ai felini erano state date in pasto carcasse di pollo. Gli esami autoptici rivelarono emorragie multifocali in vari organi, tra cui polmoni, cuore, timo, fegato e stomaco. A livello polmonare si riscontrarono anche distruzione degli epiteli alveolari e bronchiolari con edema intra-alveolare contenente neutrofili e macrofagi. Due degli animali presentavano anche segni di encefalite. Il virus H5N1 fu identificato in tutti i quattro felini, e ad esso fu attribuita la causa della polmonite. Fu la prima documentazione nella storia della capacità di un virus influenzale di provocare malattia nei felini selvatici (261). Le misure di biosicurezza nel contenimento dell'influenza potrebbero dunque non avere soltanto implicazioni nella salute umana e nella tutela degli allevamenti, ma anche nella salvaguardia di specie e sottospecie animali minacciate o in pericolo di estinzione. Ad esempio, il leopardo d'Arabia (*Panthera pardus nimr*, a cui è stata accorpata la sottospecie *Panthera pardus jarvisi*) è considerato in pericolo critico di estinzione (262).

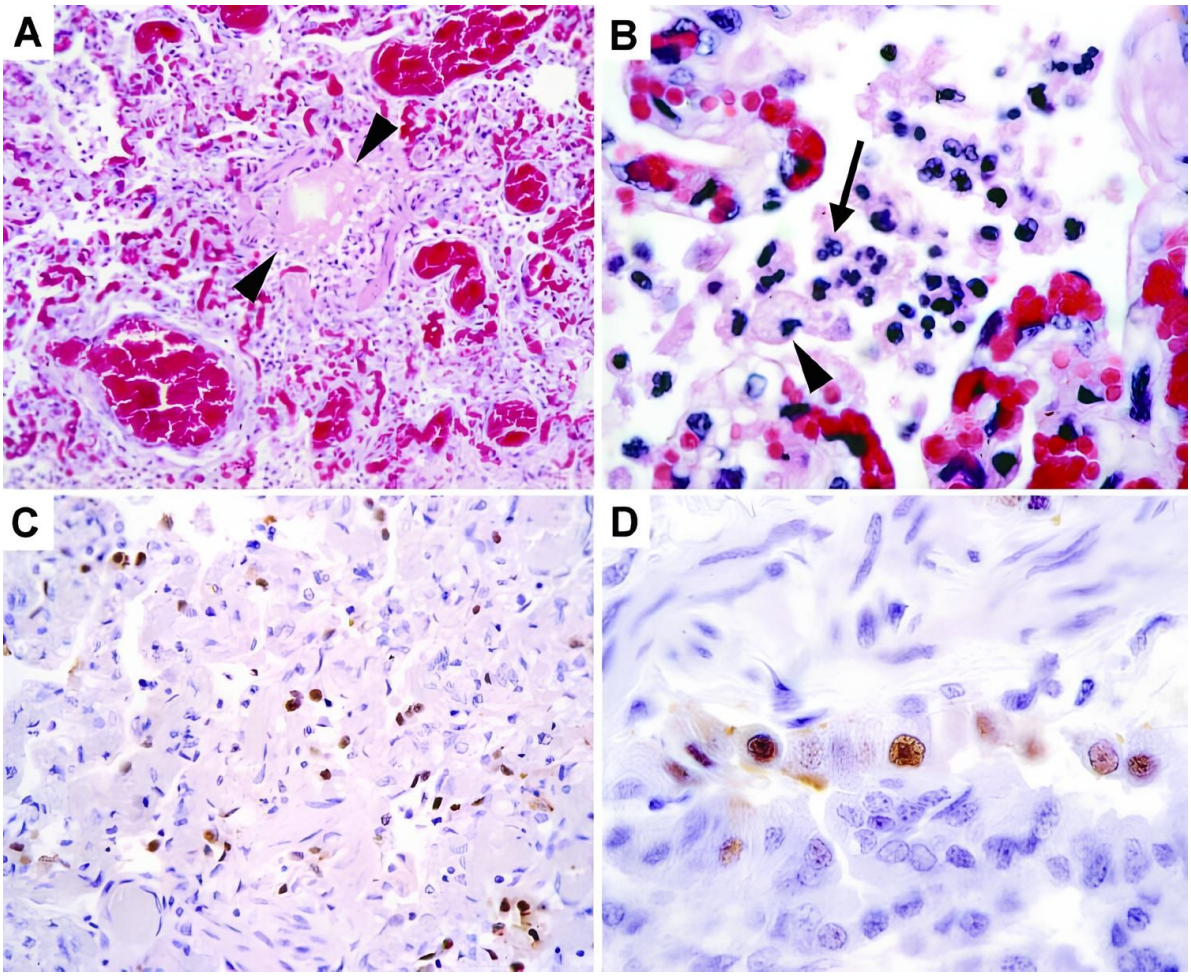

Figura 30. Preparati istopatologici e immunoistochimici di polmone di leopardo (*Panthera pardus*) (261)**. A)** Danno alveolare diffuso; gli alveoli e i bronchioli, compresi tra i due cunei, mostrano segni di edema, con un infiltrato infiammatorio esteso anche ai tessuti circostanti. **B)** Infiltrato infiammatorio intra-alveolare contenente neutrofili (freccia), e macrofagi alveolari (cuneo). **C)** La pigmentazione marrone evidenzia le cellule contenenti gli antigeni del virus influenzale nel tessuto polmonare. **D)** Cellule epiteliali di un bronchiolo contenenti gli antigeni virali.

Influenza aviaria: aspetti clinici e anatomo-patologici

Dal punto di vista strettamente clinico, i virus dell'influenza aviaria si suddividono in LPAIVs (*Low Pathogenic Avian Influenza Viruses*) e HPAIVs (*High Pathogenic Avian Influenza Viruses*) (192). I LPAIVs danno luogo ad infezioni prevalentemente asintomatiche negli uccelli selvatici. Nel pollame, tali microrganismi producono la malattia in forma subclinica o paucisintomatica, con lievi disturbi respiratori e diarrea. Occasionalmente, la trasmissione al pollame di virus LPAI dei sottotipi H5Nx e H7Nx, dove x rappresenta una delle proteine NA da 1 a 9, si accompagna all'evoluzione del virus in ceppi altamente patogenici, chiamati HPAIVs. Questi ultimi generano infezioni molto gravi nel pollame, con elevatissima mortalità. Tale incrementata patogenicità è dovuta all'acquisizione da parte dell'HA di un sito proteolizzabile da proteasi ubiquitarie dell'ospite, che rende possibile la diffusione del virus al di fuori degli epiteli respiratorio ed intestinale (220). Le principali lesioni che si osservano negli animali colpiti sono necrosi acinare del pancreas, splenomegalia, encefalomalacia con edema perivascolare, necrosi miocardica e, nel fegato, necrosi diffusa oppure atrofia degli epatociti con istiocitosi sinusoidale (263).

Influenza umana: aspetti epidemiologici

Nell'uomo, le epidemie stagionali di influenza sono causate dai virus dell'influenza A e B. Per il primo virus, i sottotipi H1N1 e H3N2 sono quelli attualmente circolanti. Quando si verifica una pandemia, i ceppi pandemici si diffondono rapidamente dall'area di origine al resto del mondo in virtù della notevole diversità antigenica rispetto ai preesistenti ceppi, la quale contribuisce anche ad una maggior virulenza, sostituendosi ai ceppi già presenti (220).Taluni studi indicano le popolazioni del Sud-est asiatico come serbatoio permanente per la diffusione dei ceppi influenzali epidemici nel resto del mondo (264,265), mentre secondo altri autori le epidemie influenzali si potrebbero propagare a partire da più popolazioni separate(266). Tuttavia, la mancanza di dati riguardanti altre aree del mondo, tra cui l'Africa e il Sud America, rende tali valutazioni quantomeno approssimative (220). Le epidemie influenzali si sviluppano nei mesi invernali nelle regioni dal clima temperato, ove i bassi valori di umidità e temperatura che si registrano durante l'inverno favoriscono la trasmissione dei virus influenzali. Alquanto differente è la presentazione epidemiologica dell'influenza nei Paesi tropicali (220). Vi sono circa 1 miliardo di casi di influenza all'anno, di cui 3-5 milioni di casi gravi. L'influenza provoca dai 290.000 ai 650.000 casi di morte per cause respiratorie all'anno (267). Il 99% delle morti nei bambini al di sotto dei 5 anni di età per infezioni del tratto respiratorio inferiore legate all'influenza si verifica nei Paesi in via di sviluppo (268).

Influenza umana: aspetti clinici

La trasmissione interumana dei virus influenzali si verifica tramite la via respiratoria. I virus si possono contrarre mediante inalazione di goccioline respiratorie o di aerosol o per auto-inoculazione dopo il contatto con fomiti (220). I sintomi si presentano dalle 24 alle 96 ore dal contagio. L'esordio della patologia è repentino, con febbre, astenia, brividi, cefalea, mialgie e malessere generale, spesso accompagnati da tosse, faringodinia, raucedine, congestione nasale e rinorrea. Negli anziani e nei soggetti immunocompromessi, tali sintomi si possono manifestare in forma più lieve, verosimilmente per il più modesto rilascio di citochine, ma in questi pazienti risulta più probabile la successiva progressione dell'infezione a polmonite. Nei soggetti in età pediatrica, la sintomatologia respiratoria potrebbe essere più leggera o addirittura assente, anche se sussiste l'eventualità di convulsioni febbrili (220). La maggior parte dei pazienti guarisce in una settimana (267). In altri casi si assiste invece ad un quadro clinico ben più grave, con l'insorgenza di polmonite (220). Questa può instaurarsi come polmonite virale primaria oppure come polmonite secondaria batterica. La polmonite virale primaria si osserva più spesso in pazienti affetti da patologie cardiovascolari, ed è caratterizzata da un rapido peggioramento dei sintomi con febbre, tosse, dispnea e cianosi. Gli esami radiografici evidenziano spesso riscontri bilaterali compatibili con una sindrome da distress respiratorio acuto. Gli agenti patogeni più frequentemente coinvolti nella polmonite secondaria batterica forma sono lo *Streptococcus pneumoniae* e lo *Staphilococcus aureus*. Questa patologia interviene dopo un periodo di remissione dagli iniziali sintomi influenzali, e si manifesta con febbre, tosse, e consolidazione polmonare alla radiografia. Altre complicazioni polmonari dell'influenza comprendono bronchioliti e laringotracheobronchioliti (220). Esistono poi complicanze non pneumologiche, tra cui quelle cardiache, che comprendono aritmie, infarto miocardico, miocarditi e tamponamento cardiaco, e quelle neurologiche, come gli accidenti cerebrovascolari e le encefaliti (269). Sebbene siano rare, sono state segnalate anche complicazioni a livello del fegato, con danno epatocellulare, epatite ed insufficienza

epatica(270–273). Il virus aviario A(H7N7) è stato inoltre associato a congiuntiviti nell'uomo(274). La diagnosi di influenza è spesso eseguita sulla base della sintomatologia (220). Tuttavia, essendo i sintomi influenzali causati da molti altri virus, tra cui il virus respiratorio sinciziale, gli esami *gold standard* per la diagnosi di influenza sono le colture virali su campioni biologici e la RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) per l'individuazione di sequenze RNA specifiche per i virus influenzali sui campioni (220). Il metodo più efficace per la prevenzione dell'influenza è la vaccinazione (267).

Anatomia e istologia patologica dell'influenza

I virus influenzali si replicano nelle cellule epiteliali dell'intero albero respiratorio. I riscontri istologici nei pazienti influenzali sono aspecifici; per tale ragione, l'esame istologico non è sufficiente per definire la diagnosi di influenza (275).

Istopatologia delle vie aeree superiori

Alcuni dei riscontri patologici universalmente riconosciuti per l'influenza sono segni di faringite, tracheite e bronchite. Nello stadio acuto, si notano spesso distruzione multifocale e desquamazione dell'epitelio colonnare pseudostratificato, sovente con la presenza del solo strato basale dell'epitelio, con marcato edema della sottomucosa. Il materiale cellulare necrotico può subire fagocitosi da parte dei macrofagi. Le lesioni sono in genere distribuite irregolarmente, con aree di alterazione dell'epitelio alternate a zone normali. Nelle fasi successive si può osservare rigenerazione epiteliale con metaplasia squamosa. Fenomeni di necrosi e desquamazione coinvolgono anche l'epitelio dei dotti delle ghiandole mucipare della trachea e dei bronchi. Nei bronchioli, nelle fasi iniziali, l'epitelio si manifesta eritematoso, cosparso di materiale schiumoso contenente sangue. In tempi successivi, si evidenzia necrosi dell'epitelio ciliato e ghiandolare bronchiolare. Potrebbe verificarsi desquamazione epiteliale con formazione di membrane ialine. Il lume bronchiolare può esibire infiltrati di neutrofili. Gli spazi interstiziali possono mostrare edema ed infiltrati infiammatori. Gli spazi aerei potrebbero contenere edema con materiale fibrinoso e neutrofili. La necrosi epiteliale bronchiolare può essere accompagnata da necrosi dell'intera parete, emorragie peribronchiali e polmonite peribronchiale. Nelle vie aeree superiori, al di là delle alterazioni epiteliali, l'infezione influenzale si associa a congestione vascolare, iperemia, edema e infiltrati infiammatori della tunica propria e della sottomucosa. Gli infiltrati neutrofili osservabili in tali sedi sono in genere modesti, mentre infiltrazioni di neutrofili più massicce sono indicative di un'infezione batterica secondaria. Ben più importante è invece l'infiltrato di linfociti, plasmacellule e macrofagi nella sottomucosa e nella tunica propria nell'infezione virale primaria (275).

Istopatologia delle basse vie aeree: polmonite da virus influenzali

Anche per i polmoni, come pure visto per le alte vie aeree, i riscontri istologici differiscono per ogni stadio della patologia. Tuttavia, a causa della progressione dell'infezione e della peculiare organizzazione anatomica del polmone, segni distintivi di fasi diverse della malattia si possono presentare allo stesso tempo in segmenti diversi dello stesso polmone. Nelle fasi iniziali della polmonite da virus influenzali, si notano trombosi capillare, necrosi focale delle

pareti alveolari e comparsa di membrane ialine. Queste ultime si sviluppano prima nei bronchioli e nei dotti alveolari, diventando successivamente evidenti anche negli alveoli. Un aspetto molto importante è la necrosi dell'epitelio alveolare con vacuolizzazione, picnosi nucleare e desquamazione dell'epitelio nel lume alveolare. Notevoli quantità di materiale cellulare desquamato possono essere osservate nel lume degli alveoli, dei dotti alveolari e dei bronchioli, con una fagocitosi di tali detriti da parte di macrofagi. In seguito, si assiste alla parziale o totale scomparsa dell'epitelio alveolare. La presenza dei macrofagi alveolari può talvolta essere massiva nella polmonite virale. La marcata iperemia della parete alveolare è dovuta alla congestione vasale, la quale porta inoltre all'ispessimento dei setti alveolari. I trombi fibrinosi si identificano sia nei dotti sia nei setti alveolari, e questi ultimi presentano infiltrati di neutrofili ed eosinofili negli stadi iniziali della polmonite. L'infiltrato riscontrabile nelle fasi più avanzate è invece caratterizzato prevalentemente da linfociti e plasmacellule. La necrosi della parete alveolare potrebbe essere il risultato di eventi trombotici; le aree necrotiche sono caratterizzate da infiltrati infiammatori ed essudato fibrinoso. Un altro riscontro tipico è l'edema intra-alveolare. Si possono inoltre verificare emorragie intra-alveolari a causa della necrosi dell'endotelio. Le emorragie possono essere talmente estese da poter essere avvistate già alla sezione macroscopica. Negli stadi successivi si ha una rigenerazione dell'epitelio alveolare, con iperplasia degli pneumociti di tipo II e metaplasia squamosa. Un'altra peculiarità delle fasi tardive è lo sviluppo di fibrosi, che si manifesta anche come fibrosi interstiziale alveolare e può accompagnarsi a bronchiolite obliterante e a polmonite organizzativa. Un ulteriore connotato degli stadi più avanzati è la fagocitosi di eritrociti da parte dei macrofagi (275).

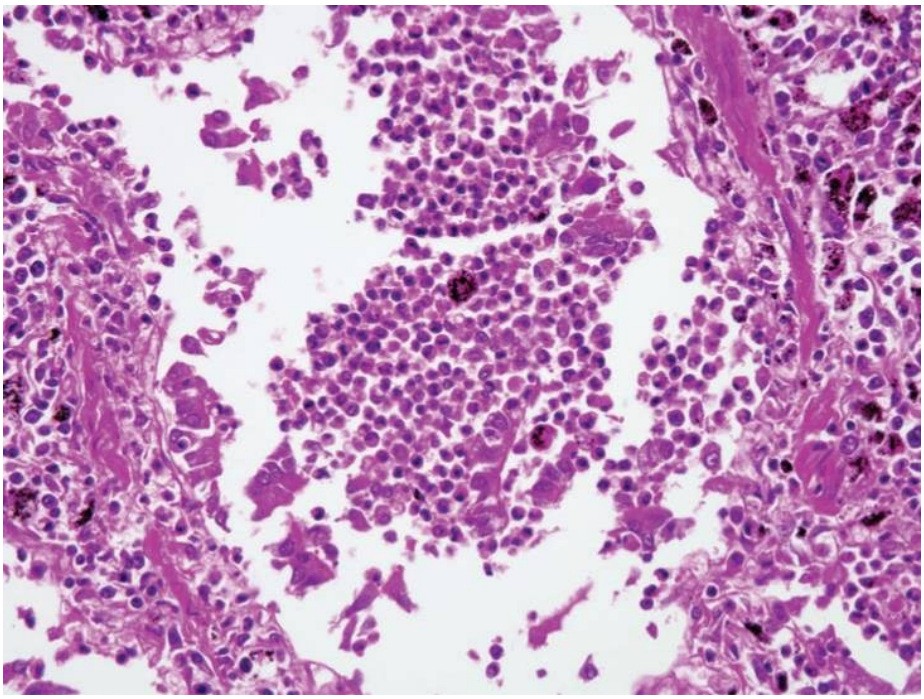

Figura 31. Preparato istologico di polmone di un paziente influenzale del 1918 (275)**.** Sezione di un bronchiolo in cui si evidenzia necrosi della parete bronchiolare con desquamazione intraluminale dell'epitelio. Il lume è occupato da un massiccio infiltrato infiammatorio contenente abbondanti neutrofili e macrofagi. Imponenti infiltrati di simile composizione si individuano anche nella parete bronchiolare e nei tessuti circostanti.

IMMUNIZZAZIONE

Nei precedenti Capitoli è stato esposto come l'organismo sia in grado di formare risposte immunitarie agli agenti microbici a cui viene esposto. Tuttavia, l'immunità può anche essere indotta artificialmente prima o dopo l'incontro con il patogeno al fine di proteggere l'organismo dai suoi effetti nefasti.

Immunizzazione passiva

L'immunizzazione passiva consiste nella somministrazione parenterale di anticorpi preformati in forma di immunoglobuline e sieri immuni umani o animali (276,277). Si tratta di una misura preventiva o terapeutica che conferisce una protezione solo temporanea, non inducendo una memoria immunitaria. Si ricorre a tale trattamento nei casi di immunodeficienza primarie o acquisite, oppure qualora il soggetto fosse stato esposto o potrebbe essere esposto ad un agente patogeno al quale non è immune, o ancora, quando la malattia sia già in atto e il suo andamento sia tumultuoso o sia necessario un intervento immediato (276). All'immunizzazione passiva si può ricorrere anche per antagonizzare una tossina prodotta da un microrganismo o il veleno di scorpioni, ragni e serpenti (277). L'immunoglobulina umana normale è un prodotto ematico frazionato costituito in prevalenza da IgG (276). Si somministra per via intramuscolare nei casi di ipogammaglobulinemie e per la profilassi pre- e post-esposizione di alcune malattie, tra cui l'epatite A ed il morbillo. L'immunoglobulina endovenosa (IVIG, *IntraVenous Immune Globulin*) consente di somministrare dosi ripetute e più elevate di immunoglobuline; alcuni dei suoi impieghi sono la prevenzione e il trattamento di immunodeficienze primarie, infezioni da HIV nei bambini, e malattie autoimmuni. Esiste inoltre l'immunoglobulina sottocutanea (SCIG, *SubCutaneous Immune Globulin*), indicata per il trattamento di immunodeficienze primarie. Le immunoglobuline iperimmuni sono preparazioni ad alto titolo di anticorpi contro uno specifico antigene. Si ricavano dal plasma di pazienti convalescenti o artificialmente immunizzati. Alcuni esempi di immunoglobuline iperimmuni sono quelle contro la rabbia e l'epatite B. Il loro uso non è privo di rischi: può infatti verificarsi l'anafilassi (276).

Immunizzazione attiva

L'immunizzazione attiva è indotta mediante la somministrazione di un vaccino (278). Per vaccino si intende un medicinale biologico costituito da una sospensione di microrganismi vivi o attenuati, di antigeni di tali agenti patogeni, oppure di tossoidi, ovvero tossine prodotte da un microrganismo rese artificialmente innocue pur mantenendo il loro potenziale immunogeno (278). Nella composizione di molti vaccini rientrano anche adiuvanti, inseriti al fine di garantire una più efficace risposta del sistema immunitario al microrganismo o alle sue componenti contenuti nella preparazione (279). Tra gli eccipienti possono essere previsti conservanti e stabilizzanti, aggiunti per preservare le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche del prodotto nel corso del suo arco di vita. Un vaccino può inoltre contenere tracce di sostanze utilizzate nei processi di fabbricazione del medicinale. Il vaccino elicita una risposta immunitaria del tutto simile a quella prodotta a seguito dell'infezione naturale, escludendo però le manifestazioni patologiche della malattia che l'agente patogeno causa. La memoria immunitaria che si genera grazie alla vaccinazione permette un rapido intervento

dell'immunità adattativa qualora il soggetto venisse a contatto con il microrganismo relativo al vaccino precedentemente somministrato, proteggendo di fatto l'individuo dalla patologia. I vaccini sono utilizzati come metodo di prevenzione primaria delle malattie infettive, essendo somministrati a soggetti a rischio di esposizione ad un microrganismo prima che l'esposizione possa verificarsi (279). Taluni vaccini, tra cui l'antitetanico e l'antirabbico, rappresentano inoltre una misura di profilassi post-esposizione, in quanto impiegati anche in casi di emergenza in cui si presume che il paziente possa essere stato esposto all'agente patogeno (280,281). Tale trattamento non può tuttavia considerarsi sostitutivo della vaccinazione primaria, pur rendendosi la profilassi post-esposizione comunque necessaria a seguito di una possibile esposizione al microrganismo. Non si trascuri altresì il ruolo di alcuni vaccini nella prevenzione di certi tumori: è il caso dei vaccini anti-epatite B e anti-HPV (*Human Papilloma Virus*). L'HBV è infatti causa accertata di carcinoma epatocellulare, mentre l'HPV provoca carcinomi della cervice uterina, del pene e dell'ano (282,283).

Immunità di gregge

Per lo sviluppo di un vaccino è indispensabile dimostrarne l'attività di protezione sul singolo individuo (279). Tuttavia, sussiste un altro aspetto fondamentale legato alla vaccinazione, ossia l'estensione della protezione immunitaria all'intera comunità, nota come immunità di gregge. In una comunità, la copertura vaccinale non può estendersi ad ogni singolo individuo, poiché taluni soggetti possono non vaccinarsi per vari motivi, mentre altri, seppur vaccinandosi, potrebbero non acquisire una protezione efficace. Nondimeno, se un numero sufficiente di soggetti viene vaccinato, qualora la vaccinazione proteggesse non solo dallo sviluppo della malattia, ma anche dalla trasmissione dell'agente patogeno, gli individui vulnerabili verrebbero indirettamente tutelati (279).

Programmi vaccinali

I bambini al di sotto dei 5 anni acquisiscono una protezione a seguito della vaccinazione meno massiccia rispetto ai bambini più grandi, agli adolescenti e agli adulti. Malgrado ciò, essendo il rischio di contrarre malattie dell'infanzia più elevato al di sotto dei 5 anni, i programmi vaccinali sono stati strutturati in modo da vaccinare i bambini in questa fascia di età, tutelando i soggetti più suscettibili nonostante la più debole protezione (279).

Classificazione dei vaccini

I vaccini si classificano a seconda del principio attivo che contengono e delle modalità di produzione (279). I vaccini vivi attenuati contengono un microrganismo il quale, malgrado la ridotta virulenza, rimane vitale. Esso è in grado di replicarsi nell'ospite in una tale maniera da generare una massiccia risposta immunitaria, ma non al punto da indurre significative manifestazioni di malattia. I vaccini inattivati sono basati su microbi uccisi sfruttando il calore o l'esposizione ad alcune sostanze. Uno dei vaccini anti-epatite A (HAV, *Hepatitis A Virus*, virus dell'epatite A) rientra in questa categoria. I vaccini ad antigeni purificati non contengono microrganismi interi, bensì gli antigeni ricavati dal patogeno mediante tecniche di purificazione. I vaccini a tossoidi hanno come principi attivi delle tossine proteiche prodotte da

un microrganismo inattivate con formaldeide, note appunto come tossoidi o anatossine. In tempi più recenti si sono sviluppati vaccini grazie a tecnologie del DNA ricombinante. Questi includono la produzione di antigeni ricombinanti, di vaccini a DNA e a RNA, e la costruzione di particelle virus-simili (*virus-like particles*) e di vettori virali (279). I vaccini non vivi necessitano spesso di essere formulati in associazione ad adiuvanti per aumentarne l'immunogenicità (279). Adiuvanti molto usati sono i sali di alluminio, il cui meccanismo d'azione rimane incerto (284). Più recentemente sono stati introdotti adiuvanti innovativi, tra cui MF59 e AS03, emulsioni di olio in acqua contenenti squalene adottate in alcuni vaccini antinfluenzali (285). In ambito oncologico, un'interessante area di ricerca è data dai vaccini antitumorali terapeutici (286), tra cui i vaccini a cellule dendritiche (287). Un'ulteriore classificazione dei vaccini si basa sulla via di somministrazione, che può essere intramuscolare, sottocutanea, orale o intranasale. Ancora dal punto di vista formulativo, i vaccini si definiscono monocomponenti qualora proteggessero da un solo agente patogeno; un esempio è il già menzionato vaccino anti-epatite A. Sono invece chiamati multivalenti quei vaccini che combinano gli antigeni di più microrganismi in un unico medicinale, come il vaccino anti-epatite A+B, designato per proteggere sia dall'HAV sia dall'HBV (288).

Immunità garantita dai vaccini

Si ritiene che la risposta anticorpale sia il principale meccanismo mediante il quale i vaccini producono l'immunità contro un agente patogeno. L'importanza degli anticorpi emerge in maniera evidente nei soggetti affetti da diverse forme di immunodeficienza (279). I pazienti con deficit di anticorpi contraggono infatti facilmente infezioni da virus della varicella zoster (VZV), anche se, una volta contratta l'infezione, la debellano in modo sovrapponibile agli individui sani (279). Inoltre, soggetti asplenici o con ridotta funzionalità della milza, risultano molto suscettibili alle infezioni da *Streptococcus pneumoniae* (289). Questo microbo viene infatti opsonizzato da anticorpi e quindi fagocitato dai macrofagi splenici. La sua eliminazione è quindi fortemente dipendente dagli anticorpi. Gli vaccini polisaccaridici contro il già citato pneumococco (*S. pneumoniae*) e il meningococco (*Neisseria meningitidis*) si basano su polisaccaridi di superficie, caratterizzati come antigeni timo-indipendenti; questi vaccini generano dunque un'immunità puramente anticorpale. Il ruolo preponderante degli anticorpi nell'immunità è messo in luce anche dalla già discussa immunizzazione passiva. Il progressivo decremento dei livelli degli anticorpi derivanti dalla vaccinazione varia a seconda dell'antigene, del numero di dosi di richiamo somministrate e dell'età del paziente. Nel neonato si verifica una rapida diminuzione per l'assenza di nicchie nel midollo osseo un grado di ospitare cellule B a lunga emivita. La funzione dei linfociti T nell'immunità vaccinale appare più marginale rispetto a quella anticorpale. Ciononostante, nel caso di vaccini ad antigeni timo-dipendenti, i linfociti T *helper* pilotano la produzione di anticorpi nei linfonodi. Gli effetti di un deficit di cellule T si estrinsecano in una difficoltà nella risoluzione delle infezioni. Questo accade nella già menzionata infezione da VZV. Anche se il ruolo dei linfociti T nella protezione prodotta dai vaccini sembra secondario, occorre al contempo ricordare uno studio i cui risultati sono maggiormente promettenti in tal senso. Gli autori hanno individuato la formazione di immunità allo *Streptococcus pneumoniae* nel topo, indotta anche in assenza di anticorpi, a seguito di inoculazione del batterio o di un vaccino inattivato. Tale protezione è indipendente dal sierotipo polisaccaridico del microrganismo e richiede invece la presenza dei linfociti T $CD4^+$ (290).

Memoria immunitaria

La memoria immunitaria che permane dopo il declino dei livelli degli anticorpi inizialmente secreti è importante per garantire una copertura di lunga durata. In generale, la memoria immunitaria è più efficace contro le infezioni che prevedono un periodo di incubazione sufficientemente lungo affinché possa svilupparsi, nel frattempo, una risposta immunitaria al microbo (279). Quest'ultimo è il caso dell'HBV, il quale ha un periodo di incubazione dalle 6 settimane ai 6 mesi. Non esistono prove di una riduzione della protezione nel tempo dopo la vaccinazione contro l'HBV; perciò, non è necessario un richiamo del vaccino (291). Nel caso di agenti patogeni che scatenano i segni clinici di malattia dopo breve tempo dal contagio, la memoria immunitaria vaccinale potrebbe non essere sufficiente ad arginare l'infezione. Per arginare tale problema si può ricorrere a dosi di richiamo: riesponendo il sistema immunitario all'antigene, si ha un ripristino dei livelli di anticorpi ad esso specifici al di sopra di una soglia compatibile con la protezione (279).

Effetti collaterali dei vaccini

Sebbene i vaccini siano considerati sicuri, essi possono comportare effetti collaterali, al pari degli altri medicinali (279). Effetti collaterali comuni sono dolore ed edema al sito di iniezione, febbre, cefalea e malessere generale. Tra gli effetti collaterali rari, il più frequente è l'anafilassi a seguito di vaccinazione parenterale (279). I pazienti dotati di una particolare variante allelica del gene HLA-DQ erano predisposti allo sviluppo di narcolessia dopo la vaccinazione contro il virus influenzale pandemico A(H1N1) del 2009 (292).

Controindicazioni dei vaccini

La gravidanza rappresenta una controindicazione alla somministrazione dei vaccini vivi (278). Le vaccinazioni vanno inoltre posticipate nei pazienti in uno stato febbrile significativo o con una malattia grave senza febbre, ma non in caso di infezioni lievi anche accompagnate da blandi stati febbrili. I pazienti immunocompromessi possono ricevere vaccini solo vaccini diversi da quelli vivi, in quanto quest'ultimi, replicandosi, possono dare corso a gravi infezioni in questi soggetti. Qualora l'immunodeficienza derivasse da terapie con farmaci immunosoppressori, tra cui corticosteroidi e agenti alchilanti, occorre attendere il ripristino della funzione immunitaria dopo il termine della terapia prima di somministrare vaccini vivi. I pazienti affetti da HIV non devono ricevere vaccini vivi in presenza di grave compromissione immunologica, ossia con una conta di linfociti $CD4^{+}$<200 cellule/µL. I vaccini vivi non vanno inoltre somministrati in concomitanza con trasfusioni di sangue o plasma e con le immunoglobuline. Prima di un trapianto di organi solidi, il paziente va immunizzato con le opportune vaccinazioni. A seguito di un trapianto di midollo osseo, il paziente è considerato come "mai immunizzato", ossia come se non avesse mai ricevuto alcuna vaccinazione, e deve dunque ottenere tutti gli opportuni vaccini. Ai pazienti asplenici, data la loro suscettibilità a infezioni da batteri capsulati, devono essere somministrati vaccini contro pneumococco, meningococco e *Hemophilus influenzae* di tipo B (278).

Aspetti anatomici e istologici della vaccinazione intramuscolare

Quando un vaccino proteico viene inoculato nel muscolo, gli antigeni proteici in esso contenuti vengono captati ed internalizzati dalle cellule dendritiche, le quali ricevono segnali di attivazione dall'adiuvante attraverso i PRRs che esse esprimono (279). Le cellule dendritiche si immettono quindi nei vasi linfatici e migrano ai linfonodi drenanti. In tale sede, le cellule dendritiche mature presentano l'antigene ai linfociti T. Contestualmente, l'antigene che giunge ai linfonodi in forma solubile, viene captato dai linfociti B e, come accade per tutti gli antigeni timo-dipendenti, l'intervento delle cellule T attivate dall'antigene è indispensabile per indurre la reazione del centro germinativo, la maturazione dell'affinità e lo scambio isotipico anticorpale. La generazione di plasmacellule a breve emivita è responsabile dell'aumento dei livelli di IgM nelle 2 settimane successive alla vaccinazione. La memoria anticorpale è garantita dalle cellule B della memoria e dalle plasmacellule a lunga emivita che si stanziano nel midollo osseo (279).

VACCINI ANTINFLUENZALI

Il Center for Disease Control and Prevention (CDC) consiglia a tutte le persone di età superiore a 6 mesi, con rare eccezioni, di ricevere la vaccinazione antinfluenzale ad ogni stagione influenzale. Il vaccino è inoltre particolarmente raccomandato ai soggetti più suscettibili alle complicanze dell'influenza (293). La composizione dei vaccini antinfluenzali viene aggiornata annualmente su raccomandazione dell'OMS. Esistono attualmente 152 Centri Nazionali Influenza, distribuiti in oltre 129 Paesi, che si occupano della continua sorveglianza epidemiologica dei ceppi influenzali circolanti, attuata mediante esami su campioni virali di pazienti. Proprio sulle informazioni raccolte a livello globale da tali enti, l'OMS determina le proprie raccomandazioni sui ceppi vaccinali (294). I vaccini antinfluenzali disponibili in Italia sono approvati dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) o dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) (295). I vaccini antinfluenzali si distinguono in base alla via di somministrazione e alla tecnologia produttiva.

Vaccini antinfluenzali inattivati

I vaccini antinfluenzali inattivati (IIV, *Inactivated Influenza Vaccines*) sono approvati per tutte le persone di età superiore ai 6 mesi, incluse le donne incinte e i pazienti affetti da patologie croniche (296). Nelle gestanti, la vaccinazione è protettiva anche verso il nascituro, grazie all'immunità transplacentare. Gli IIV sono somministrati per iniezione intramuscolare nel deltoide o nel vasto laterale, generalmente in un'unica dosa. Tuttavia, i bambini dai 6 mesi agli 8 anni che non avessero ricevuto una vaccinazione antinfluenzale la precedente stagione necessitano di due dosi, con un intervallo tra le dosi di almeno 4 settimane. Come per gli altri vaccini per via iniettiva, reazioni a livello del sito di iniezione sono comuni. Nei soggetti che non fossero stati mai esposti ad antigeni influenzali, è possibile l'insorgenza di uno stato febbrile dopo la vaccinazione (296). Esistono diverse tecniche per la produzione di IIV, delle quali verrà fornita una breve panoramica.

Metodi di produzione di IIV non basati sul DNA ricombinante

Uno dei processi di manifattura dei vaccini antinfluenzali comporta la crescita del virus all'interno di uova embrionate di pollo (220). Il ceppo virale circolante viene riassortito con il ceppo A/Puerto Rico/8/1934, altrimenti chiamato PR8, noto per l'elevata velocità di crescita: almeno 6 segmenti di RNA di PR8 vengono ricombinati con il ceppo circolante cosicché il virus vaccinale possegga HA e NA del ceppo circolante combinate alle caratteristiche di sviluppo di PR8. Tale ceppo ricombinante è inoculato nell'allantoide di uova embrionate di pollo, ove viene amplificato. Successivamente, il liquido allantoico ad elevato titolo virale è raccolto e si effettua l'inattivazione del virus impiegando formaldeide o altri agenti alchilanti. Il virus viene a tal punto trattato con etere o detergenti per la scissione nelle componenti virali, in modo da aumentare la tollerabilità della preparazione. Segue la parziale purificazione per l'arricchimento in HA e NA (220). Un altro metodo di produzione dei vaccini antinfluenzali inattivati si esplica attraverso colture cellulari di mammifero. Oggigiorno è impiegata la linea cellulare di rene canino Madin-Darby (MDCK, *Madin-Darby Canine Kidney*) a tale scopo (220).

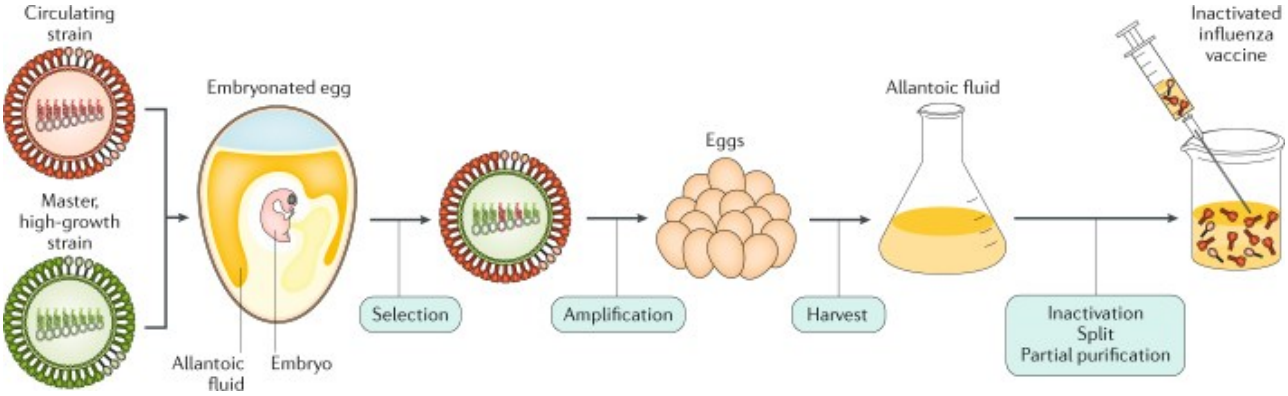

Figura 32. Schema procedurale del metodo di produzione di IIV con uova embrionate (220)**.**

Metodi di produzione di IIV basati sul DNA ricombinante

Il 2013 è stato segnato dall'introduzione di Flublok, il primo vaccino antinfluenzale ottenuto con tecniche del DNA ricombinante (220). Per ognuno dei ceppi virali che il vaccino deve rappresentare, si utilizza un distinto baculovirus esprimente l'HA del singolo ceppo. I baculovirus vengono impiegati per infettare linee cellulari immortalizzate di insetto, e l'HA viene in seguito estratta dalle cellule infettate e purificata. Il metodo ricombinante ben si presta ad arginare crisi derivanti da carenze di vaccini e dall'emergenza di ceppi influenzali pandemici, principalmente in quanto i baculovirus riescono a produrre le HA derivanti da virus differenti a velocità comparabili nelle cellule di insetto. Tali virus non necessitano quindi degli adattamenti descritti per il metodo delle uova, i quali richiedono tempo (220).

Vaccino influenzale vivo attenuato

Il vaccino influenzale vivo attenuato (LAIV, *Live Attenuated Influenza Vaccine*) viene somministrato per via intranasale. Esso è basato sul ceppo A/Ann Arbor/6/1960 per i virus dell'influenza A e sul ceppo B/Ann Arbor/1/1966 per i virus dell'influenza B. Tali ceppi sono

chiamati MDV (*Master Donor Virus*), e sono dotati di mutazioni che ne determinano l'inattivazione. Essi vengono ricombinati con i ceppi virali circolanti secondo la formula 6:2, in modo tale che il ceppo vaccinale acquisisca i segmenti di RNA relativi all'HA e alla NA dal virus circolante, e i restanti 6 frammenti dal MDV. Sono proprio questi ultimi a determinare le caratteristiche di inattivazione, che consistono nella circoscrizione della replicazione al solo tratto respiratorio superiore; ciò dipende dalla sensibilità del virus alle più alte temperature, cosicché le temperature del polmone non consentono la replicazione virale in tale distretto, essendo queste più elevate di quelle nasali e faringee. In tal modo, è impedito lo sviluppo di grave patologia (220,297). Il LAIV è approvato solo per le persone di età compresa tra i 2 e i 49 anni, con l'esclusione dei soggetti affetti da patologie di base e delle gestanti. La somministrazione è monodose, eccetto per i bambini dai 2 agli 8 anni, i quali devono ricevere due distinte dosi qualora non avessero ricevuto un vaccino antinfluenzale alla precedente stagione(296).Al LAIV sono stati attribuiti alcuni vantaggi, tra cui il conferimento dell'immunità mucosale e cellulo-mediata (220,297), e una cross-reattività degli anticorpi prodotti con ceppi circolanti non contenuti nel vaccino (298,299). Uno studio ha però evidenziato un'inefficace protezione nei confronti di ceppi A(H1N1)pdm2009 (300).

Raccomandazioni dell'OMS per i vaccini influenzali per particolari stagioni

Per la stagione influenzale 2024-25 dell'emisfero boreale, l'OMS, nel caso dei vaccini antinfluenzali trivalenti, aveva raccomandato i ceppi A/Victoria/4897/2022(H1N1)pdm09-simile, A/Thailand/8/2022(H3N2)-simile, e B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria *lineage*)-simile per i vaccini prodotti attraverso uova embrionate di pollo, e A/Wisconsin/67/2022 (H1N1)pdm09-simile, A/Massachusetts/18/2022 (H3N2)-simile, e B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria *lineage*)-simile per i vaccini prodotti mediante colture cellulari o tecniche ricombinanti (301). Per i vaccini quadrivalenti, l'OMS aveva raccomandato l'aggiunta del ceppo B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata *lineage*)-simile ai ceppi già indicati per i vaccini trivalenti, indipendentemente dalla tecnologia impiegata per l'ottenimento dei vaccini (301). Tuttavia, poiché dal marzo 2020 non si sono più verificati casi riconducibili a virus del lignaggio B/Yamagata, l'EMA Task Force, assieme al Comitato per i medicinali per uso umano (CHMP), aveva raccomandato ai titolari delle autorizzazioni all'immissione in commercio di non includere più la componente B/Yamagata nei loro vaccini (295). La transizione dagli IIV quadrivalenti ai trivalenti era stata imposta entro la stagione 2025-26, mentre il LAIV trivalente era stato reso disponibile già nella stagione 2024-25 (295).

MICROBIOMA DELL'APPARATO DIGERENTE

Per microbioma umano si intende un vasto e dinamico insieme che comprende i microrganismi, di cui batteri, funghi e virus, il loro materiale genetico, i loro elementi strutturali, e i loro prodotti metabolici che si insediano nei vari distretti dell'organismo umano a partire dalla nascita (302,303). Il concetto di microbiota, sebbene spesso usato come sinonimo di microbioma, non è coincidente con quest'ultimo. Il microbiota raggruppa tutti i microrganismi presenti in un determinato organo (303); tipici esempi sono il microbiota intestinale e quello orale. Il microbioma, quindi, rappresenta un concetto ben più ampio del microbiota. Il microbiota intestinale svolge numerose funzioni essenziali per la salute dell'ospite, e tra tutti i microbioti che risiedono nei diversi distretti, esso detiene il maggiore impatto sulla salute

(302,303). Il microbiota intestinale partecipa alla digestione dei carboidrati complessi. Di notevole importanza è inoltre la sintesi da parte di tali batteri di sostanze biologicamente attive, tra cui vitamine e acidi grassi a corta catena (SCFAs, *Short-Chain Fatty Acids*). Non da ultimo, si sottolinea l'attività regolatoria del microbiota sul sistema immunitario. Il microbiota intestinale svolge anche un'azione protettiva diretta contro i batteri patogeni, competendo con essi per i substrati energetici e lo spazio fisico. Si ritiene che il rapporto simbiotico che sussiste tra il microbiota e i vertebrati, sia il risultato di una complessa co-evoluzione. I vertebrati furono infatti i primi animali a manifestare il sistema immunitario adattativo in aggiunta all'immunità innata. Se da un certo punto di vista tale evoluzione del sistema immunitario può essere interpretata come un potenziamento della difesa contro i microrganismi, da un altro lato, queste innovazioni evolutive, tra cui l'immunità mucosale garantita dalle IgA secrete, potrebbero in realtà aver favorito l'eliminazione selettiva dei microrganismi patogeni, con la vantaggiosa conservazione di quelli utili per l'ospite (304). Un'ampia diversità del microbiota intestinale è generalmente associata ad effetti benefici sulla salute. I *phyla* maggiormente rappresentati sono *Firmicutes* e *Bacteroidota*, che assieme costituiscono circa il 90% del microbiota intestinale. I restanti *phyla* sono *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota* e *Verrucomicrobiota*. La composizione del microbiota intestinale è influenzata da un grande numero di fattori legati all'ospite, quali la funzionalità del sistema immunitario, la capacità metabolica del fegato e le condizioni fisiologiche in genere, e di fattori ambientali, tra cui le abitudini alimentari, l'assunzione di farmaci e l'esposizione a inquinanti (302). Il microbiota intestinale presenta una certa resilienza, per cui esso ripristina rapidamente la sua composizione a seguito di sollecitazioni di breve durata ed intensità, in virtù della sua notevole plasticità (302,305). Tuttavia, stimoli nefasti prolungati nel tempo, tra cui assunzione frequente di taluni additivi alimentari, *stress* psicofisico e terapie prolungate con antibiotici, possono condurre a profondi squilibri del microbiota intestinale, favorendo al contempo la proliferazione di microrganismi patogeni (302). Le alterazioni del microbiota intestinale sono correlate a numerose condizioni patologiche, tra cui obesità, diabete, malattie infiammatorie croniche, malattie del fegato, malattie neurodegenerative e malattia infiammatoria intestinale (304,306,307). Una predominanza di taluni generi di batteri, quali *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, è generalmente associata ad effetti benefici. Malgrado ciò, un'eccessiva sovrabbondanza di batteri normalmente considerati benigni potrebbe promuovere lo sviluppo di condizioni patologiche in alcuni casi. Un eccesso di *Lactobacillus*, ad esempio, è stato constatato nelle feci e nei campioni delle mucose del duodeno, dell'ileo e del colon di pazienti affetti dalla proliferazione batterica dell'intestino tenue (308,309). Comprendere le complesse relazioni tra il microbiota, la salute e le patologie è fondamentale per poter razionalmente consigliare probiotici, prebiotici e adattamenti dietetici al fine di prevenire un deterioramento dello stato di salute e per promuovere, ove necessario, un miglioramento delle condizioni cliniche.

Specificità di ceppo

A livello tassonomico, ciascun *taxon* di microrganismi non è necessariamente predittivo del tipo di effetti che i microbi che in esso ricadono esercitano sull'ospite. L'attività dei microrganismi sull'organismo è infatti definita a livello di ceppo. Non a caso, infatti, le autorità regolatorie deputate all'assegnazione di indicazioni sulla salute ai probiotici in base alla loro composizione, stabiliscono tali *claims* in base al singolo ceppo batterico o fungino (302). Molti ceppi del batterio *Escheritia coli*, ad esempio, sono non patogeni e parte integrante del

normale microbiota intestinale, mentre i ceppi EPEC (*Escheritia coli* enteropatogeno), ETEC (*Escheritia coli* enterotossigeno) ed EHEC (*Escheritia coli* enteroemorragico), sono patogeni associati a gravi malattie dell'apparato digerente (310). La differenza funzionale che si riscontra tra diversi ceppi di una stessa specie microbica può quindi talora rivelarsi abissale. Anche tra i ceppi di specie universalmente considerate patogene si possono osservare delle diversità. A titolo di esempio, i ceppi di *Helicobacter pylori*, batterio che provoca gastriti, possono essere generalmente classificati sulla base della presenza o dell'assenza dell'isola di patogenicità *cag*, che codifica per la proteina CagA (311). Tale tossina è responsabile di una risposta infiammatoria cronica a livello delle cellule della mucosa dello stomaco (311), con aumento della proliferazione ed alterazioni del fenotipo cellulare, predisponendo il paziente al carcinoma gastrico (311–314). In ultima analisi, i ceppi dotati di *cag* sono più virulenti di quelli che non la riportano (311).

Metaboliti del microbiota intestinale

Essendo la composizione del microbiota un dato individuale, è difficoltoso identificare dei marcatori universali per valutare le funzioni del microbiota intestinale (302). Tuttavia, alcune sostanze la cui sintesi o modificazione è operata dai microrganismi intestinali hanno ricevuto una particolare attenzione. SCFAs, acidi biliari e metaboliti del triptofano sono prodotti a cui spesso si fa affidamento per valutare la salute intestinale e la funzionalità del microbiota. Gli SCFAs, tra cui acetato, propionato e butirrato, sono il risultato della fermentazione batterica delle fibre alimentari. Questi acidi grassi rappresentano una fonte energetica per le cellule del colon, favoriscono l'integrità della barriera intestinale, detengono effetti antinfiammatori e regolano il sistema immunitario. Sebbene gli SCFAs possano considerarsi indicatori dell'assunzione di fibre e dello stato del microbiota intestinale, i loro livelli possono variare in base alla composizione del microbiota e alla dieta. Gli acidi biliari vengono sintetizzati dal fegato a partire dal colesterolo. Immessi nel duodeno, essi subiscono modificazioni da parte dei batteri. Gli acidi biliari sono quindi utilizzabili come indicatori dell'impatto del microbiota sul metabolismo dell'ospite, ma la genetica individuale e il ricircolo enteroepatico rendono il quadro alquanto problematico. I metaboliti del triptofano, quali l'indolo e la chinurenina, forniscono una visione più ampia e completa della salute intestinale, essendo essi generati sia dal microbiota sia dall'ospite stesso. Tuttavia, le condizioni fisiologiche dell'ospite e la dieta aggiungono ulteriori variabili a questa valutazione. Anche taluni gas prodotti dal microbiota intestinale sono indicatori dello stato di salute intestinale in relazione alla composizione del microbiota. La misurazione delle concentrazioni di tali gas si può effettuare mediante *breath test* (302). Eccessi di metano e di batteri producenti metano sono stati associati alla sindrome dell'intestino irritabile associata a stipsi, mentre elevati livelli di idrogeno e idrogeno solfuro e di microrganismi producenti questi gas sono stati osservati nella variante associata a diarrea (315).

Barriera intestinale

La barriera intestinale è costituita dallo strato di muco che ricopre la mucosa, dai peptidi antimicrobici, dalle cellule epiteliali tra loro unite dalle giunzioni occludenti e dalle cellule dell'immunità. L'integrità della barriera intestinale è essenziale per l'appropriato assorbimento dei nutrienti, il rapporto simbiotico con il microbiota, la protezione dai microbi patogeni e

un'ottimale funzione immunitaria. La permeabilità della barriera intestinale, spesso scatenata da alterazioni del microbiota, condizioni infiammatorie e sostanze tossiche, consente agli agenti patogeni e alle tossine presenti nel lume di attraversare la mucosa, accedendo al circolo sistemico. La mucosa del colon è esposta ad una moltitudine di specie microbiche con le quali essa mantiene, nella maggior parte dei casi, un rapporto simbiotico. Tale simbiosi è particolarmente evidente con i batteri anaerobi obbligati. Come precedentemente esposto, gli SCFAs, sono importanti substrati energetici per i colonociti. Nei colonociti, gli SCFAs prodotti da questi microrganismi promuovono la β-ossidazione degli acidi grassi mediante attivazione del recettore PPAR-γ (316). Il consumo di ossigeno dovuto alla β-ossidazione favorisce condizioni di ipossia nel lume del colon (317). In tal modo, i batteri anaerobi obbligati, mediante i loro prodotti, alimentano le condizioni ideali per la loro stessa crescita; contestualmente, essi ostacolano quella dei batteri anaerobi facoltativi, tra i quali figurano alcuni importanti patogeni (316). Inoltre, la diminuzione dell'attivazione di PPAR-γ che consegue ad una patologica deplezione di batteri producenti butirrato aumenta l'espressione di iNOS nei colonociti e la produzione diossido nitrico (316). Il nitrato che si origina a partire dall'ossido nitrico nel lume intestinale rappresenta un ulteriore accettore di elettroni per i batteri anaerobi facoltativi (318). Un altro elemento fondamentale della barriera intestinale è lo strato di muco. La secrezione mucosa è una dispersione acquosa di mucine, presentante caratteristiche di viscoelaticità impartite da questi polisaccaridi. Affinché risulti protettivo, lo strato di muco deve possedere un certo spessore, in modo tale da ostacolare con sufficiente efficacia l'accesso dei batteri luminali alla mucosa. Il muco è soggetto ad un continuo ricambio, essendo ininterrotti i processi di sintesi, secrezione e degradazione ad esso relativi (302). Nell'ambito della barriera intestinale è essenziale anche il ruolo delle cellule del sistema immunitario. Linfociti B, linfociti T, cellule linfoidi innate e cellule mieloidi sono in costante comunicazione con il microbioma intestinale (302). Tali rapporti si basano su un fine equilibrio: le cellule T attivate a livello intestinale agiscono salvaguardando l'eterogeneità compositiva del microbiota intestinale e al contempo contrastando i microrganismi patogeni (319). Oltre a svolgere le funzioni già descritte, gli SCFAs giocano un ruolo anche nella regolazione dell'immunità legata all'intestino, sia in riferimento al compartimento innato sia a quello adattativo. Il butirrato promuove la differenziazione dei linfociti B e delle plasmacellule, favorendo la secrezione di IgA(302).Nell'ambito della differenziazione dei linfociti T regolatori (Treg), il butirrato promuove l'espressione del fattore di trascrizione Foxp3 e dell'IL-10. Gli SCFAs, inoltre, inibiscono la produzione di IL-17 e di IL-22 da parte dei linfociti T γδ dell'intestino cieco e del colon; il propionato dimostra il maggiore effetto in tal senso (320). Il butirrato guida la differenziazione dei macrofagi aumentandone le capacità antimicrobiche; tale acido grasso incrementa l'espressione dei peptidi antimicrobici in queste cellule mediante l'inibizione dell'HDAC3 (istone deacetilasi 3) (321).

Fegato

Il fegato svolge le funzioni di regolazione metabolica e di detossificazione dagli xenobiotici. Al contempo, il fegato è anche considerato un organo dell'immunità innata (322). Invero, il fegato sintetizza proteine di fase acuta e fattori di coagulazione, oltre a ospitare un considerevole numero di cellule dell'immunità, tra cui macrofagi, cellule T NK, linfociti T γδ e cellule T invarianti associate alle mucose (MAIT) (322). I macrofagi epatici comprendono varie sottopopolazioni, tra cui le cellule di Kupffer, residenti nell'organo, ma anche macrofagi derivanti dai monociti reclutati dal sangue. I macrofagi del fegato captano e fagocitano microbi

e detriti presenti nel sangue e si comportano da APC (322). Il microbiota intestinale e il fegato sono tra loro in stretta comunicazione, tanto da evidenziarsi un asse bidirezionale fegato-intestino (302). Un microbioma epatico è stato identificato nell'uomo e nel topo, sebbene esso sia meno abbondante di quello intestinale. Nel topo, il microbiota epatico va incontro a importanti modificazioni nel corso dell'età, divenendo più disomogeneo. Il microbiota epatico è dipendente da quello intestinale, e le funzioni immunitarie epatiche dipendono dal microbiota ivi residente: a trattamenti con antibiotici nel topo consegue una deplezione dei leucociti epatici, riguardante sia i linfociti sia i macrofagi (323). Il fegato produce, a partire dal colesterolo, acidi biliari essenziali per la digestione e l'assimilazione degli acidi grassi e delle vitamine liposolubili. La bile defluisce nelle vie biliari e viene immagazzinata temporaneamente nella colecisti. In concomitanza con i pasti, la cistifellea scarica il secreto biliare nel coledoco, che lo convoglia nel duodeno. I sali biliari transitano nel duodeno, nel digiuno, nell'ileo, e infine nell'intestino crasso. Già nel duodeno, e successivamente nel digiuno, nell'ileo, nel cieco e nel colon, il microbiota ivi residente attua modificazioni enzimatiche degli acidi biliari. I prodotti che si generano possono essere anche chimicamente molto distanti dagli acidi biliari. I regimi di modificazione sono inoltre regione-specifici. Gli acidi biliari secondari esercitano delle azioni su diversi tipi di cellule della parete intestinale, inclusi i neuroni (324). La maggior parte degli acidi biliari sono riassorbiti a livello dell'ileo terminale. Tale processo è mediato da sistemi di trasporto dedicati (325). A seguito dell'assorbimento intestinale, gli acidi biliari si introducono nella vena porta, attraverso la quale essi raggiungono dapprima il fegato, poi altri organi attraverso la circolazione sistemica (324). Nel fegato, gli epatociti recuperano gli acidi biliari che giungono ai sinusoidi epatici (325). Sono stati identificati trasportatori e recettori che rispondono agli acidi biliari in vari organi. Gli acidi biliari si legano ad alcuni recettori nucleari influenzando il metabolismo energetico e le funzioni immunitarie innate e adattative(325). Un esempio di recettore nucleare degli acidi biliari è il recettore X dei farnesoidi (FXR), la cui espressione è elevata nei distretti deputati alla ricircolazione enteroepatica degli acidi biliari, soprattutto nell'ileo (325,326). Il recettore TGR5 (*Takeda G-protein Receptor 5*) media invece alcuni effetti immunosoppressivi degli acidi biliari sui macrofagi (327,328). Taluni acidi biliari secondari promuovono lo sviluppo dei linfociti Treg Foxp3^{+} intestinali esprimenti il fattore di trascrizione RORγt (*Retinoid-related Orphan Receptor γt*) (329,330). Il fegato ha un ruolo di spicco nella modulazione delle funzioni immunitarie, e sono molteplici le modalità mediante le quali il fegato interagisce con il microbioma intestinale. Alcuni fattori di produzione epatica influiscono sulla permeabilità intestinale e sull'immunità mucosale, coinvolgendo conseguentemente il microbiota residente. Anche la regolazione dell'infiammazione sistemica da parte del fegato può sortire effetti sul microbioma (302). Le patologie croniche epatiche, come la malattia epatica associata a disfunzione metabolica (MASLD) si associano ad alterazioni del microbioma intestinale (302). In condizioni fisiologiche, il fegato è esposto ad antigeni microbici derivanti dal microbiota intestinale, che vi giungono tramite la vena porta, anche a fronte di una barriera intestinale integra, senza che ciò implichi risposte infiammatorie epatiche (302). Questo fenomeno è in parte dovuto alla presenza di alcune sottopopolazioni di macrofagi a funzione immunosoppressiva nelle zone periportali epatiche. Tali macrofagi sequestrano antigeni batterici tramite il recettore *scavenger Marco* e producono IL-10, citochina antinfiammatoria. L'induzione di tali macrofagi è parzialmente mediata dall'acido isoallolitocolico, un acido biliare secondario prodotto da alcune famiglie batteriche del microbiota intestinale. I macrofagi antinfiammatori epatici sono diminuiti in modelli murini di steatoepatite non alcolica (NASH) e di colangite sclerosante primitiva (PSC) (331). L'attività di rimozione dal sangue delle endotossine che transitano nella vena porta da parte dei macrofagi epatici è essenziale per prevenire l'infiammazione sistemica che le endotossine causerebbero. Invero, l'endotossemia metabolica, ossia un patologico

incremento dei livelli plasmatici di endotossine, ha un ruolo diretto nella patogenesi del diabete e dell'obesità (332,333). Inoltre, in un modello murino è stato notato che una disbiosi intestinale artificialmente indotta accelera la progressione della fibrosi epatica, per cui si presume un ruolo epatoprotettivo dei microrganismi commensali intestinali (334).

Probiotici, prebiotici: definizioni

Secondo la *World Gastroenterology Organisation* (WGO), un probiotico è un microrganismo vivo che, quando somministrato alle dosi adeguate, conferisce un beneficio alla salute dell'ospite (335). I requisiti fondamentali di un probiotico sono la capacità di resistere nel tubo digerente, con particolare riferimento al pH dello stomaco, al fine di raggiungere allo stato vitale il sito d'azione, la mancanza di qualsiasi gene trasferibile che impartisca resistenza agli antibiotici, la non patogenicità e la non tossicità (336). Il probiotico differisce dal prebiotico, definito invece come un ingrediente selettivamente fermentato che genera cambiamenti nella composizione o nell'attività del microbiota al fine di apportare benefici alla salute (335).

Lattobacilli: il genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus*, inscritto nel *phylum Firmicutes*, include specie di batteri di forma bastoncellare Gram-positivi, anaerobi facoltativi e non sporigeni (337). I lattobacilli metabolizzano i carboidrati generando acido lattico. Dal punto di vista metabolico, i lattobacilli si suddividono in tre gruppi. Gli omofermentativi obbligati, come il *L. acidophilus*, rilasciano acido lattico come prevalente prodotto della fermentazione dei carboidrati. Gli eterofermentativi facoltativi, tra cui *L. casei* e *L. plantarum*, danno luogo, in determinate condizioni, ad acido lattico, etanolo, acido acetico e anidride carbonica, mentre gli eterofermentativi obbligati, che comprendono il *L. reuteri*, producono sempre ed inevitabilmente l'appena menzionata serie di sostanze. I lattobacilli colonizzano molti distretti dell'organismo umano, in particolare l'apparato digerente e il tratto genitale femminile. Tra i lattobacilli e l'ospite umano sussiste una relazione di tipo mutualistico: l'ospite fornisce i substrati energetici e un ambiente ottimale ai batteri, ricevendo da quest'ultimi un contributo alla digestione di talune sostanze alimentari e una protezione da agenti patogeni (337). Essendo ben caratterizzato il rapporto tra i lattobacilli e la salute, la FDA (*Food and Drug Administration*) degli Stati Uniti ha riconosciuto questi batteri come generalmente sicuri, mentre l'EFSA (*European Food Safety Authority*) ha rilasciato la presunzione qualificata di sicurezza per i lattobacilli, avallandone di fatto l'uso come fermenti nell'industria alimentare e l'impiego come probiotici (337). L'assunzione di lattobacilli in forma di probiotici conferisce benefici mediante diversi meccanismi (337).

Effetti dei lattobacilli sull'immunità innata ed acquisita

I lattobacilli rilasciano PAMPs che interagiscono con recettori dell'immunità innata, tra cui TLRs e NODs (*Nucleotide-binding Oligomerization Domains*), facenti parte delle cellule immunitarie e dell'epitelio intestinale (337,338). Si ritiene che i lattobacilli rafforzino la barriera intestinale incrementando la produzione di muco (337). *L. casei* T21 isolato da una biopsia gastrica umana ha migliorato il decorso e gli esiti dell'infezione da *Clostridium difficile* in un

modello murino, aumentando contestualmente la secrezione di mucine per incremento dell'espressione del gene MUC2 in una linea di colonociti stimolata con *C. difficile* (339). L'attività protettiva dei lattobacilli è attuata anche mediante la modulazione dell'espressione dei peptidi antimicrobici, i quali sono generalmente suddivisi in cateclidine e defensine (337). I ceppi *L. acidophilus* PZ1138 e *L. fermentum* PZ1162 hanno dimostrato di indurre l'espressione della β-defensina 2 nella linea di colonociti Caco-2 mediante attivazione di NF-kB, AP-1 e della via MAPK (340). Il *L. reuteri* aumenta l'espressione della β-defensina 1 e di CATH-2 nell'ileo e nel cieco di pulcini da allevamento (341). I lattobacilli secernono inoltre essi stessi peptidi antimicrobici, noti come batteriocine; questi peptidi svolgono una funzione batteriostatica o battericida nei confronti di altre specie batteriche (342). Sempre in materia di salvaguardia della barriera intestinale, gli SCFAs acetato, propionato e butirrato, che pure i lattobacilli producono, stimolano la formazione delle giunzioni occludenti nelle linee di colonociti Caco-2 (337,343). Alcuni ceppi di lattobacilli aumentano la produzione di IgA secretorie (337). *L. paracasei* MCC1849 aumenta i livelli di IgA secretorie nell'intestino tenue e nei polmoni, con un incremento della proporzione di cellule B secernenti IgA e di linfociti T follicolari nelle placche di Peyer murine (344). *L. plantarum* AYA induce la differenziazione dei linfociti B nelle placche di Peyer in plasmacellule secernenti IgA e aumenta i titoli di IgA secretorie nell'intestino tenue e nei polmoni, proteggendo i topi dall'infezione influenzale (345).

Ruolo dei lattobacilli nelle malattie dell'apparato digerente

I lattobacilli prevengono i danni all'apparato digerente nelle infezioni da determinati agenti patogeni (337). Molti ceppi di lattobacilli si sono rivelati efficaci nella prevenzione della diarrea associata ad antibiotici, una manifestazione che si origina da un profondo squilibrio del microbiota intestinale (337,346). Il suo quadro può variare da una lieve diarrea alla colite pseudomembranosa, malattia spesso associata al *C. difficile* (337). Il già citato *Helicobacter pylori*, infettando la mucosa gastrica, si rende responsabile di gastriti croniche, ulcere peptiche e adenocarcinoma gastrico in alcuni pazienti, lasciandone altri asintomatici (347). L'infezione da *H. pylori* si tratta con una serie di antibiotici abbinata ad un inibitore di pompa protonica; tuttavia, lo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte del batterio pone ostacoli al successo di tale terapia (337). Uno studio ha riscontrato che l'assunzione di uno yogurt contenente *L. gasseri* OLL2716 prima e durante la terapia eradicante contro *H. pylori* ne migliora l'efficacia, rintracciando la causa del fallimento terapeutico nella resistenza alla claritromicina (348). Inoltre, nei pazienti sottoposti a supplementazione di *L. reuteri* durante o dopo la terapia, la frequenza di eradicazione è notevolmente aumentata (349). Importanti sono anche gli effetti dei lattobacilli contro lo stress ossidativo, dovuti al rilascio di antiossidanti, tra cui il glutatione. In tal merito, *L. fermentum* Suo ha dimostrato protezione dal danno gastrico indotto mediante HCl ed etanolo in un modello murino (350).

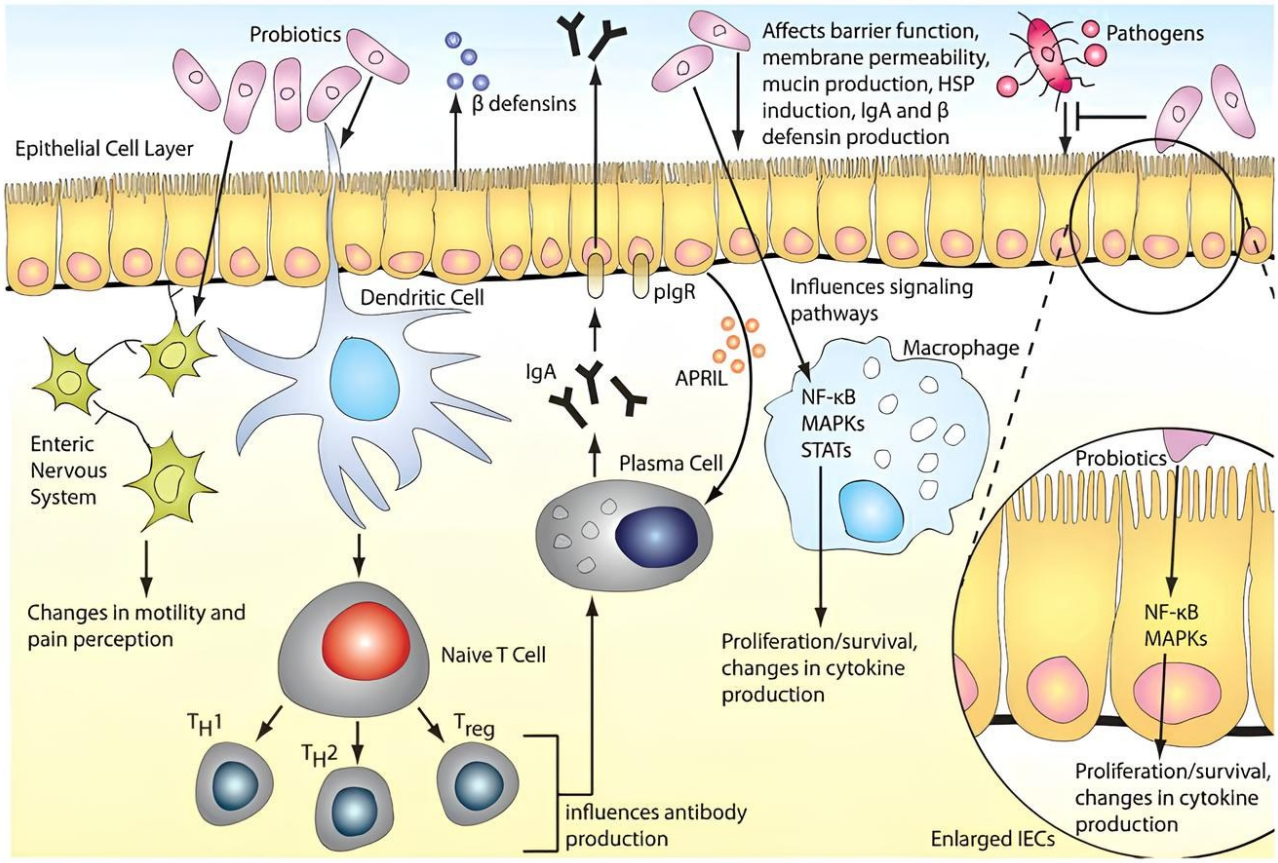

Figura 33. Rapporti tra i probiotici, la barriera intestinale, l'immunità innata, il sistema immunitario adattativo e il sistema nervoso enterico (351).

Effetto adiuvante dei probiotici nella vaccinazione

L'uso dei probiotici per migliorare l'esito delle risposte immunitarie è stato proposto sulla base delle modificazioni che tali prodotti nutrizionali impartiscono al microbiota intestinale e dell'influenza di quest'ultimo sul sistema immunitario (352). Non vi è certezza riguardo ai meccanismi mediante i quali i probiotici possano esercitare un effetto adiuvante sulla vaccinazione (353). Tuttavia, è stato osservato un aumento della proteina C reattiva in seguito all'assunzione di probiotici nei bambini (354). La sintesi di tale proteina da parte del fegato è indotta dall'IL-6, la quale agisce inoltre come fattore di differenziazione dei linfociti B. Esperimenti *in vitro* rivelano anche che i probiotici, seppur con ampia variabilità tra loro, sono in grado di indurre risposte infiammatorie nelle cellule dendritiche, tra cui il rilascio di IL-6 (355–357). Nell'uomo, la somministrazione orale di *Lactobacillus plantarum* produce un responso pro-infiammatorio transiente nel duodeno mediante la modulazione di vie di segnalazione dipendenti da NF-κB (358). Partendo da questi dati, si potrebbe ipotizzare che la produzione di IL-6 indotta dai probiotici nelle cellule dendritiche del tessuto linfoide associato al tubo digerente possa potenziare le reazioni immunitarie agli antigeni vaccinali a livello dei linfonodi ove esse si sviluppano (353). Inoltre, essendo l'epitelio specializzato delle placche di Peyer intestinali in grado di trasportare antigeni dal lume al sottostante tessuto linfoide, è possibile che tali componenti microbiche accedano al circolo sistemico e sortiscano stimoli pro-infiammatori nei linfonodi (353). Vi è una generale comprensione di come i batteri Gram-positivi potrebbero rilasciare componenti della loro parete, tra cui l'acido teicoico, l'acido

lipoteicoico e il peptidoglicano, nell'ambiente circostante (352). Tali componenti sono in grado di interagire con il tessuto linfoide associato all'apparato digerente e con gli altri distretti e cellule del sistema immunitario, e potrebbero apportare un beneficio all'ospite (352). Al di là di ogni possibile effetto adiuvante di queste sostanze nelle vaccinazioni, è stato dimostrato che il *Lactobacillus rhamnosus* GG è in grado di proteggere cellule normali del colon dai danni provocati dalla radioterapia. Tale riscontro è stato attribuito al rilascio graduale nelle cripte intestinali di acido lipoteicoico, agonista del recettore TLR2 dalle proprietà radioprotettive, il quale attiva inoltre i macrofagi pericriptali (359). L'attività adiuvante dei probiotici nelle vaccinazioni è stata studiata in modelli animali e nell'uomo.

Modelli animali

Alcuni degli esperimenti sugli animali sono stati effettuati per verificare l'effetto adiuvante dei probiotici nelle vaccinazioni degli animali da allevamento (352). In uno studio del 2020 si è valutato l'effetto adiuvante di spore di *Bacillus subtilis*, un probiotico per uso umano e animale, in polli immunizzati con un vaccino inattivato generato in laboratorio contro il virus influenzale aviario H9N2, somministrato per iniezione intramuscolare (360). Assunti 5 gruppi di polli, ognuno di essi è stato assegnato ad un diverso trattamento. Ad un gruppo era somministrato il solo vaccino sperimentale, ad un altro le sole spore, per un altro ancora si sono combinati il vaccino sperimentale e il probiotico, un altro gruppo è stato trattato con un vaccino commerciale anti-H9N2, e il restante è stato utilizzato come controllo negativo. I polli trattati con il vaccino sperimentale in combinazione con *B. subtilis* presentavano un titolo di IgG sieriche specifiche per il virus H9N2 molto più elevato rispetto agli altri gruppi. L'espressione delle citochine pro-infiammatorie IL-1β e IL-6 era molto maggiore negli splenociti degli animali trattati con *B. subtilis*. Tali citochine, prodotte da cellule dell'immunità innata, possono aumentare la proliferazione delle cellule T $CD4^+$ e $CD8^+$ indipendentemente dall'immunizzazione con H9N2. *B. subtilis* ha inoltre incrementato significativamente la proliferazione dei linfociti B nel gruppo in cui era stato abbinato al vaccino sperimentale. L'uso di *B. subtilis* come adiuvante nei polli vaccinati ha anche indotto l'espressione di IFN-γ e IL-17 nei linfociti T in modo molto più massiccio rispetto al vaccino commerciale ad adiuvante oleoso (360). In altri interessanti lavori si è studiato l'effetto adiuvante dei probiotici nelle vaccinazioni contro patogeni umani in modelli animali. In tale contesto, si sono talora utilizzati animali gnotobionti, ossia adattati a crescere con una ben determinata selezione di microrganismi oppure, per simulare al meglio le condizioni applicative umane, trapiantati con un microbiota intestinale umano (352). Per uno di questi studi, basato su un modello suino, suini nati in condizioni *germ-free* sono stati colonizzati con i ceppi *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium lactis* Bb12 (361). Lo scopo del lavoro era di verificare l'effetto adiuvante di tali probiotici su una vaccinazione anti-rotavirus umano. A tal uopo, si è adoperato un rotavirus umano attenuato. Gli animali sono stati assegnati ai quattro gruppi di trattamento, ovvero il gruppo sottoposto al vaccino e a colonizzazione con il probiotico ("Vac+Pro"), il gruppo trattato con il solo vaccino ("Vac"), il gruppo trattato solo con il probiotico ("Pro"), e il controllo negativo. Tutti i gruppi sono stati successivamente sottoposti all'infezione con un rotavirus umano virulento. Parte degli animali ha subito l'eutanasia prima dell'infezione. La totalità dei suini "Vac+Pro" e un'alta percentuale dei "Pro" non manifestavano dispersione fecale del virus dopo l'infezione, e i "Vac+Pro" presentavano più lievi sintomi di malattia rispetto ai "Vac". I due probiotici hanno sortito quindi effetti protettivi aggiuntivi rispetto al solo vaccino. In entrambi i gruppi assegnati ai probiotici, i batteri hanno colonizzato l'intestino tenue e il colon, sebbene le conte dei probiotici nel cieco e nel colon

degli animali dopo l'infezione fossero inferiori rispetto a quelle precedenti all'infezione. Il gruppo "Vac+Pro" mostrava una frequenza più elevata di linfociti T *helper* nel duodeno e nell'ileo prima dell'infezione rispetto al "Vac". Il gruppo "Vac+Pro" dimostrava inoltre numeri più elevati di linfociti T $CD8^+$ nel sangue e nella milza, e di cellule T $CD4^+$ nella milza, rispetto ai suini "Vac"; ciò indica che i probiotici potrebbero istruire l'immunità cellulo-mediata a fronte del vaccino contro il rotavirus o dell'infezione da virus selvatico. I gruppi vaccinati mostravano un maggior numero di cellule T $CD4^+$ attivate ($CD25^+$) nel sangue e nell'ileo prima dell'infezione; inoltre, il gruppo "Vac+Pro" esibiva più alte conte di linfociti T $CD4^+CD25^+$ rispetto al Vac, prima dell'infezione. Parallelamente, a seguito dell'infezione, nel gruppo "Vac+Pro" si notava un più elevato numero di cellule secernenti IgA nel duodeno rispetto al "Vac". Il gruppo "Vac+Pro" presentava anche linfociti T secernenti IFN-γ nel sangue e nella milza in maggior numero rispetto ai suini "Vac", sia prima sia dopo l'infezione, indicando una polarizzazione in senso Th1 in risposta al vaccino da parte del probiotico. Parallelamente, nei suini "Vac+Pro" il numero di cellule T IFN-γ^+ nell'ileo era inferiore a quello del gruppo "Vac". Interessanti, dunque, sono le discrepanze che si evidenziano tra le attività regolatorie dei probiotici sull'immunità sistemica e quelle sull'immunità mucosale: tali effetti appaiono connotati da una certa specificità distrettuale. I gruppi assegnati ai probiotici mostravano un aumento delle cellule T $CD4^+$ regolatorie (Treg$CD4^+Foxp3^+$) nell'ileo e nel sangue prima dell'infezione. Anche il vaccino, indipendentemente dai probiotici, ha indotto i linfociti Treg $CD4^+$ nel sangue. Dopo l'infezione, i gruppi vaccinati esibivano conte di linfociti Treg $CD4^+$ e Treg $CD8^+$ nell'ileo e di Treg $CD8^+$ nel sangue più alte in confronto al gruppo di controllo. Anche i soli probiotici si sono rivelati in grado di aumentare la frequenza delle cellule Treg $CD4^+$ nell'ileo a seguito dell'infezione, evidenziando un ruolo immunomodulatore intestinale post-infezione dei probiotici. Al contrario, nella milza, i linfociti Treg $CD4^+$ e $CD8^+$ si sono rivelati più frequenti nel gruppo di controllo rispetto al "Pro". Il gruppo "Pro+Vac", alla luce della polarizzazione Th1 precedentemente esposta, presentava un rapporto tra le risposte Th1 e Treg spostato verso le Th1 nel sangue e nella milza, sia a priori sia a posteriori della *challenge* con il rotavirus virulento. Nel gruppo "Vac+Pro" si rilevavano livelli sierici di IFN-α, IFN-γ e IL-12 significativamente più elevati rispetto al gruppo "Vac" nei giorni seguenti all'immunizzazione; tale riscontro indica l'effetto adiuvante dei probiotici sul vaccino inattivato anti-rotavirus. Inoltre, i più bassi livelli di IL-4 del "Pro+Vac" rispetto al "Vac" risultano compatibili con i precedenti riscontri di una polarizzazione in senso Th1 dei probiotici negli animali vaccinati. L'IL-12 è rimasta elevata nei "Vac+Pro" anche dopo l'infezione. A conferma dell'immunomodulazione promossa dai due ceppi probiotici vi erano anche la riduzione delle citochine pro-infiammatorie IL-8, IL-17, IL-12 e TNF-α e il contestuale incremento del TGF-β nei suini "Pro" rispetto al controllo (361).

Studi nell'uomo

I risultati degli studi eseguiti sull'uomo sono alquanto disomogenei, rendendo la materia piuttosto controversa. L'effetto adiuvante di probiotici nelle risposte umorali ai vaccini nell'uomo è al centro di un'eccellente revisione sistematica i cui Autori hanno segnalato risultati favorevoli solo nella metà degli studi esaminati(362). Si esamina ora uno studio randomizzato a doppio cieco che ha coinvolto 60 pazienti tra i 65 e gli 85 anni, immunizzati con un vaccino influenzale trivalente per la campagna vaccinale 2006-2007 in Spagna (363). I ceppi vaccinali erano A/Wisconsin/67/2005 NYMC X-161B (H3N2), A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), e B/Malaysia/2506/2004. Si valutava il possibile effetto adiuvante del ceppo

Lactobacillus plantarum CECT 7315/7316. I volontari sono stati casualmente suddivisi in tre gruppi di trattamento, chiamati “A”, “B” e “C”. Al gruppo A è stata assegnata una dose giornaliera di $5x10^9$ CFU di *L. plantarum* CECT 7315/7316 in 20 grammi di latte scremato in polvere, al B una dose giornaliera di $5x10^8$ CFU di *L. plantarum* CECT 7315/7316 in 20 g di latte scremato in polvere, mentre al C è stato fornito un placebo, con 20 g di latte scremato in polvere al giorno. L’assunzione del probiotico o del placebo è iniziata alcuni mesi dopo la vaccinazione e si è estesa per tre mesi. Mediante ELISA, è stata effettuata la quantificazione delle IgA, delle IgM e delle IgG specifiche per i ceppi influenzali vaccinali nel plasma dei volontari prima e dopo il trattamento con il probiotico. Un aumento significativo delle IgG virus-specifiche a seguito dell’assunzione del probiotico si registrava solo nel gruppo assegnato al dosaggio elevato di *L. plantarum* CECT 7315/7316. Le IgA sono risultate incrementate in entrambi i gruppi sottoposti al probiotico, ma non nel gruppo placebo. Non si misurava, invece, un aumento significativo dei titoli di IgM in alcuno dei gruppi, nonostante il gruppo a più alto dosaggio esibisse una tendenza all’incremento di IgM. I pazienti che, prima del prelievo di fine trattamento, avevano contratto l’influenza esibivano concentrazioni di IgG, ma non degli altri anticorpi, inferiori rispetto alle controparti non infettate. Nell’interpretazione di tale riscontro, gli Autori hanno supposto che le IgG abbiano un ruolo preminente rispetto ad altre Ig nella *clearance* dei virus influenzali (363). In un altro lavoro si è esaminata l’attività immunomodulante del *L. rhamnosus* GG nella risposta al LAIV. Anche in questo caso, è stato istituito uno studio randomizzato a doppio cieco (364). Ai 42 partecipanti, di cui 39 hanno effettivamente completato lo studio, è stato somministrato il LAIV per la stagione 2007-2008, contenente i ceppi A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)-simile, A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)-simile e B/Malaysia/2506/2004-simile. Ciascun partecipante è stato quindi casualmente assegnato al trattamento o al placebo, con la somministrazione *bis in die* per 28 giorni di una capsula in gelatina contenente $1x10^{10}$ CFU di *L. rhamnosus* GG e 295 mg di inulina nel caso del trattamento, e 355 mg di inulina per il placebo. La prima capsula è stata assunta subito dopo il vaccino. Campioni di siero sono stati ricavati prima della somministrazione del vaccino e durante e dopo il trattamento. Il titolo di anticorpi contro gli antigeni vaccinali è stato determinato attraverso HAI (*HemAgglutinin Inhibition assay*). Riguardo ai ceppi A(H1N1) e B contenuti nel LAIV, non si osservavano differenze nelle frequenze di sieroconversione tra il gruppo trattato con probiotico e quello trattato con placebo. Tuttavia, al 28^ giorno dall’immunizzazione, per il ceppo A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) il gruppo assegnato al probiotico manifestava una frequenza di sieroconversione più elevata rispetto al placebo in maniera statisticamente significativa. Tale discrepanza perdurava anche al 56^ giorno, pur avendo perso la significatività statistica precedentemente osservata (364).

TESSUTO LINFOIDE ASSOCIATO ALLE MUCOSE

Il tessuto linfoide associato alle mucose (MALT, *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*), è un sistema disperso di cellule e di aggregati linfoidi organizzati, privi di capsula, confinati entro le mucose (365). Le funzioni principali del MALT sono la produzione e la secrezione nel lume degli organi delle IgA in risposta a specifici antigeni, ma esso ospita anche risposte immunitarie Th2, Th1 e cellulo-mediate. Il MALT si suddivide in varie branche, distinte sulla base del distretto anatomico che ciascuna di esse occupa; alcune di queste sono il tessuto linfoide associato all'apparato digerente (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), il tessuto linfoide associato ai bronchi (BALT, *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*), il tessuto linfoide associato al nasofaringe (NALT, *Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue*), il tessuto linfoide associato alla congiuntiva (CALT, *Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue*), e il tessuto linfoide associato ai dotti salivari (DALT, *salivary Duct-Associated Lymphoid Tissue*). Dal punto di vista funzionale, il MALT è suddivisibile in siti induttivi e siti effettori. I siti induttivi comprendono reazioni del centro germinativo: in risposta ad antigeni timo-dipendenti, i linfociti T si attivano e coordinano la reazione del centro germinativo, con uno scambio isotipico delle cellule B verso le IgA. A seguito di tali fenomeni, i linfociti T e B migrano ai siti effettori, stabilendosi come tessuto linfoide vastamente disseminato nella lamina propria di tutte le mucose (365). Tale interconnessione tra i siti induttivi di un sito anatomico e quelli effettori di un altro distretto ha preso il nome di "sistema immunitario mucosale comune" (365,366). Un brillante studio nel topo ha dimostrato che il sacco endolinfatico dell'orecchio interno è in grado di sostenere risposte immunitarie specifiche a seguito di un inoculo antigenico nell'anello linfatico di Waldeyer, tracciando un collegamento immunologico tra questi due distretti anatomicamente non contigui (367). Nei siti effettori avvengono la secrezione e il trasporto transmucosale delle IgA dimeriche secondo le modalità già descritte in un precedente Capitolo. Nei roditori, anche gli epatociti secernono IgA immettendole nei dotti biliari e, percorrendo il coledoco, questi anticorpi raggiungono il tubo digerente (368). Al di là degli aggregati linfoidi, un'altra importante componente del MALT è costituita dai già citati linfociti intraepiteliali (365). Tali cellule sono per la totalità linfociti T, in prevalenza $CD8^+$. Nei roditori, un'elevata proporzione dei linfociti intraepiteliali presenta il TCR γδ (365,369–371), e molti manifestano la forma omodimerica αα del CD8 (372). I linfociti intraepiteliali sono situati tra le cellule epiteliali di tutte le mucose in quantità alquanto abbondanti, sussistendo un rapporto di un linfocita per ogni 4-6 cellule epiteliali (365). Al di là di questa stima di massima, occorre tuttavia considerare la variabilità dei numeri di linfociti intraepiteliali tra i vari distretti. Ad esempio, per l'ileo umano sono stati calcolati 13 linfociti per ogni 100 enterociti, mentre un rapporto di circa 5 linfociti per ogni 100 cellule epiteliali è stato riportato per il colon (373). In aggiunta, una stima per il digiuno umano suggerisce un numero compreso tra 9 e 40 linfociti per 100 enterociti in assenza di malattia (374). I linfociti intraepiteliali si collocano spesso alla base dell'epitelio (368). Un ulteriore aspetto peculiare comune a molti tessuti linfoidi associati alle mucose è l'associazione degli aggregati linfoidi ad un particolare epitelio, definito come epitelio associato ai follicoli (375). Istologicamente, l'epitelio associato ai follicoli differisce dalle regolari mucose luminali, ma l'aspetto probabilmente più saliente è la presenza delle cellule M. Queste cellule epiteliali, mediante la transcitosi di antigeni dal lume alla regione sottoepiteliale, permettono al sottostante tessuto linfoide di scansionare gli antigeni luminali (375). Le caratteristiche e le funzioni dell'epitelio associato ai follicoli, ora solo accennate, saranno illustrate in maniera particolareggiata nella trattazione sulle placche di Peyer.

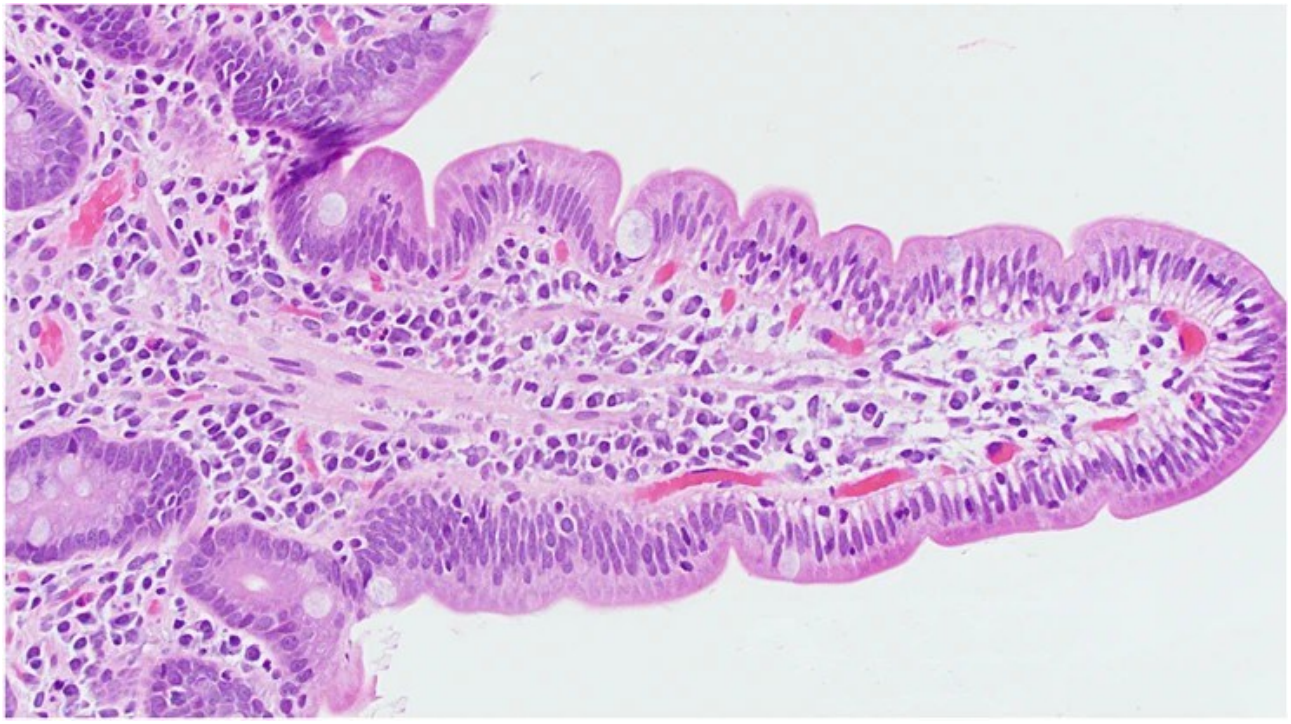

Figura 34. Mucosa duodenale (376)**.** Microfotografia di una sezione di villo duodenale privo di caratteri di patologia. Nello spessore della mucosa si possono notare i linfociti intraepiteliali, i quali risultano ben distinguibili dai nuclei degli enterociti viste le loro dimensioni minori e la colorazione maggiormente intensa rispetto a questi ultimi.

Tessuto linfoide associato ai bronchi (BALT)

Il BALT non è costitutivamente presente in tutte le specie di mammiferi. Nell'uomo e nel topo il suo sviluppo è indotto nel caso di infezioni polmonari o di altre forme di infiammazione a carico dei polmoni (377). In tali specie esso si identifica pertanto con il termine iBALT (*inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*), ed è riconosciuto come tessuto linfoide terziario, vista la sua comparsa in corso di patologie. In altre specie, tra cui il ratto e il coniglio, il BALT è un tessuto costitutivo. Nel ratto, il BALT è assente nei neonati e compare nelle settimane successive alla nascita. Il BALT è costituito da aggregati linfoidi comprendenti follicoli, in cui i linfociti sono intercalati da un reticolo formato dalle cellule stromali. Tali aggregati si posizionano nella parete bronchiale, al di sotto di aree specializzate dell'epitelio respiratorio caratterizzate dall'assenza di cellule mucipare e dalla paucità di cellule ciliate. In tale contesto, si evidenziano inoltre una regione sottoepiteliale a cupola e la presenza, nel sovrastante strato epiteliale, dei linfociti intraepiteliali (377). L'epitelio a cupola sovrastante il BALT contiene inoltre cellule M (377,378), le quali discendono da cellule staminali dell'epitelio respiratorio, apparentemente grazie al contatto con il sottostante tessuto linfoide (377). Al pari delle cellule M delle placche di Peyer, le cellule M del BALT effettuano la pinocitosi e la fagocitosi del materiale luminale. Nonostante le relative analogie con il BALT, l'iBALT presenta differenze rispetto al primo sul piano anatomico. L'iBALT manifesta una notevole eterogeneità strutturale. Invero, la sua morfologia varia da piccoli aggregati di linfociti B e T e cellule dendritiche a strutture ben più organizzate. Analogamente ad altri organi linfoidi già trattati, tali strutture comprendono i follicoli, formati da linfociti B residenti in un reticolo formato dalle cellule follicolari dendritiche e comprendenti talvolta un centro germinativo, separati da aree interfollicolari ospitanti linfociti T e cellule dendritiche. Mentre il BALT costitutivo si colloca

nei bronchi prossimali, l'iBALT si dispone nelle regioni perivascolari, peribronchiali e interstiziali di vie aeree più distali del polmone. In effetti, lo spazio perivascolare rappresenta un importante sito per la formazione dell'iBALT. Essendo i vasi sanguigni spesso paralleli alle vie aeree nei polmoni, la sede perivascolare dell'iBALT lo colloca frequentemente a ridosso delle vie aeree. Gli aggregati di iBALT, inoltre, non si accompagnano necessariamente ad un sovrastante epitelio a cupola con infiltrazione linfocitaria. In condizioni di infiammazione polmonare, lo spazio perivascolare diviene un sito di accumulo di linfociti. Tali formazioni, in cui i linfociti si trovano fittamente stipati, sono note come *cuffing* peribronchiale (379,380). Tuttavia, il *cuffing* non rappresenta necessariamente iBALT. Affinché di iBALT si possa effettivamente parlare, infatti, l'aggregato deve presentare una ben definita architettura tissutale, con segregazione dei linfociti in aree B e T, cellule reticolari, venule ad endotelio alto e vasi linfatici (380,381). Dal punto di vista istologico, il BALT e l'iBALT sono strutturati in aggregati linfoidi di dimensioni e livelli organizzativi variabili (377). I follicoli linfoidi isolati sono aggregati non molto coesi di linfociti B, accompagnati da scarsi linfociti T. Il BALT comprende anche strutture maggiormente ampie e raggruppanti più follicoli linfoidi, ben somiglianti alle placche di Peyer. Tali formazioni si trovano prevalentemente nelle vie aeree superiori, soprattutto in corrispondenza delle biforcazioni dell'albero bronchiale. Le plasmacellule sono tipicamente situate alla periferia del BALT. Nel BALT si identificano inoltre nervi peptidergici e catecolaminergici (377). I follicoli, ossia le zone B, rappresentano la componente predominante, e talora anche esclusiva, degli aggregati del BALT (380,382). La gran parte di tali cellule B sono vergini ed esprimono IgM e IgD in superficie (383); con lo scambio isotipico, tali linfociti B iniziano a produrre IgG, IgA e IgE (380). Nel BALT costitutivo dotato di un epitelio a cupola, il follicolo si trova subito al di sotto dell'epitelio. I follicoli ospitano anche le cellule follicolari dendritiche e linfociti T $CD4^+$ (380,384). Le zone T circondano i follicoli e occupano gli spazi tra gli stessi (384); talvolta, la zona T può essere molto ristretta e formata da un aggregato alquanto lasso di linfociti T (382). Le zone T ospitano anche cellule reticolari, cellule dendritiche, macrofagi, plasmacellule, e talora eosinofili e neutrofili, anche se le cellule dendritiche sono più densamente presenti (380,384–386). Nel BALT, le venule ad endotelio alto si dispongono nelle zone T oppure al confine tra le aree T e i follicoli (382,387). Le venule ad endotelio alto del BALT manifestano dei riscontri biochimici assai atipici: esse non esprimono MAdCAM-1, esprimendo invece PNAd, e possiedono inoltre livelli di VCAM-1 più elevati rispetto agli altri organi linfoidi secondari (387,388). Tale unicità biochimica potrebbe permettere ai linfociti, dopo l'avvenuta attivazione nel BALT, la maturazione nei linfonodi ilari del polmone, e la ricircolazione nei vasi linfatici e sanguigni, di migrare in maniera selettiva nel BALT, ove svolgere la propria funzione nella difesa immunitaria da antigeni inalati (388). L'immunizzazione del GALT e del BALT porta all'incremento della migrazione dei linfociti nel BALT, come rivelato da uno studio i cui linfociti prelevati dal dotto toracico di ratti che avevano subito o meno un'immunizzazione ad un antigene per via intraperitoneale ed intratracheale venivano somministrati per via endovenosa a ratti riceventi, immunizzati contro lo stesso antigene attraverso le stesse vie (389). Si è evidenziato che i linfociti migravano nel BALT dei ratti riceventi immunizzati in maniera notevolmente maggiore rispetto ad un gruppo di controllo in cui né i donatori né i riceventi erano stati immunizzati (389). Nel BALT, i linfociti T vergini migrano e si attivano: in un modello murino di tubercolosi, in cui, parallelamente allo sviluppo dei granulomi tubercolari, ha avuto luogo anche l'insorgenza dell'iBALT, le cellule T specifiche per l'antigene si sono attivate anche negli animali privi di organi linfoidi secondari, ottenuti mediante *knockout* del recettore della LTβ (390). I linfociti T della memoria specifici per l'antigene si sono accumulati nei polmoni degli animali LTB-/- con frequenze minori rispetto ai *wild-type*, ma con numeri comparabili a questi ultimi (390). Al tempo stesso, in un modello murino di influenza privo di linfonodi, placche di Peyer e milza si è osservato che le cellule T

CD8$^+$ specifiche per il virus si sviluppano regolarmente nelle regioni interfollicolari dell'iBALT (387). In un altro studio nel topo è emerso che l'iBALT supporta il mantenimento di linfociti T CD8$^+$ della memoria, anche in assenza di organi linfoidi secondari (391). I vasi linfatici occupano le aree T e l'interfaccia tra queste ultime e i follicoli (382,392).

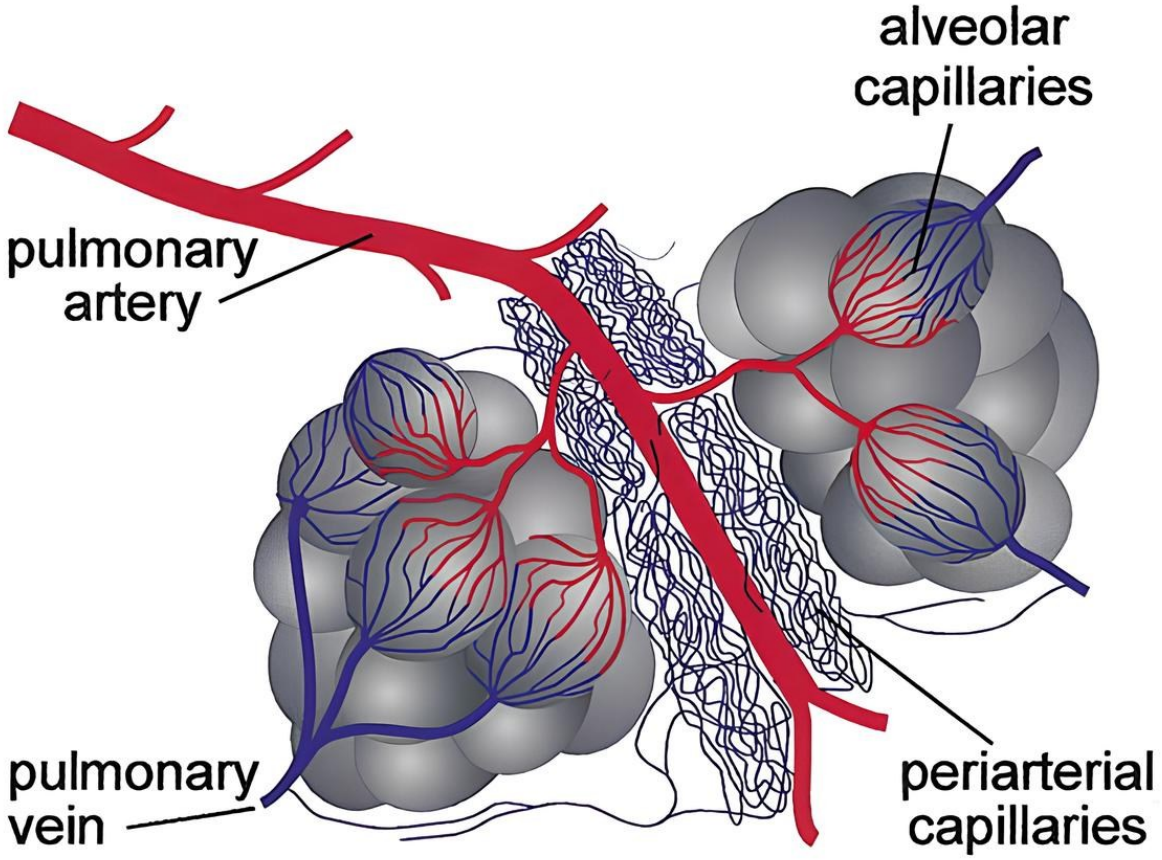

Figura 35. Spazio perivascolare polmonare (379)**.** Illustrazione di alcuni aspetti dell'anatomia polmonare umana, con particolare riferimento allo spazio perivascolare, sede di formazione del *cuffing* linfocitario e dell'iBALT, e alle sue relazioni anatomiche con gli alveoli polmonari. Un disegno particolareggiato è dedicato ai capillari perivascolari.

Istopatologia del BALT

L'apparato respiratorio, dato il suo ruolo fisiologico, è esposto a innumerevoli microrganismi patogeni (380). Al sistema immunitario, in tale ambito, è affidato il delicato compito di contrastare gli agenti patogeni e di eliminare le cellule da essi infettate senza compromettere significativamente i tessuti delle vie aeree e il tessuto polmonare. Si presume che BALT e l'iBALT rappresentino artifizi che il sistema immunitario sfrutta ai fini della difesa dalle infezioni (380). In topi splenectomizzati a genotipo LTα$^{-/-}$ attinti da radiazioni e ricostituiti con midollo osseo, chiamati SLP, è stata prodotta un'infezione influenzale (387). Dopo aver contratto l'infezione influenzale, tali animali hanno sviluppato il BALT. Si notava, in particolare, che i linfociti erano organizzati in aree T e follicoli dotati di cellule follicolari dendritiche, con netta separazione tra le due zone. Si osservavano altresì centri germinativi e venule ad endotelio alto. Inoltre, nonostante l'assenza dei linfonodi e della milza, i topi SLP manifestavano risposte B e T contro il virus sovrapponibili a quelle dei *wt*. Ancor più sorprendentemente, i topi SLP hanno mostrato un maggiore grado di sopravvivenza ad alte dosi di virus influenzale rispetto

agli animali *wt*, mentre a dosi inferiori la morbilità è stata minore nei SLP; la mancanza di organi linfoidi secondari sembra dunque sortire un paradossale effetto protettivo contro l'influenza. Emergeva anche una minore perdita di peso nei topi SLP rispetto ai wt, che hanno gli Autori hanno attribuito ad una più scarsa tempesta di citochine dovuta all'assenza dei linfonodi e della milza (387). In un altro studio si è scoperto che le risposte infiammatorie ad un'infezione virale polmonare sono influenzate da pregresse infezioni da virus diversi (393). In questo lavoro, diverse infezioni virali sono state indotte in topi non precedentemente infettati. Le infezioni con LCMV e MCMV hanno prodotto lieve infiammazione polmonare, con scarsi infiltrati di macrofagi e linfociti. Il LMCV ha inoltre indotto la formazione di BALT. Le infezioni da virus dell'influenza A e da virus del vaccino erano invece caratterizzate da un quadro ben più severo, con infiltrati di polimorfonucleati e mononucleati attorno alle vie aeree e negli spazi interstiziali ed alveolari. Gli animali immunizzati con LCMV, MCMV e virus dell'influenza A venivano successivamente sottoposti alla challenge con il virus del vaccino e sviluppavano bronchiolite necrotizzante. I topi già infettati con il virus del vaccino venivano invece impiegati come controllo. Nei topi precedentemente esposti a LCMV, tuttavia, si evidenziava un edema polmonare più contenuto rispetto al controllo, con un infiltrato prevalentemente linfocitario. I polmoni dei topi precedentemente immunizzati con LCMV erano inoltre caratterizzati da una massiccia presenza di BALT e di *cuffing* linfocitario perivascolare. Dopo *challenge* con il virus del vaccino, l'istologia dei polmoni dei topi precedentemente esposti al virus influenzale e al MCMV somigliava a quella dei reduci da LCMV, con evidenti infiltrati di mononucleati, anche se il BALT era meno intensamente rappresentato. Negli animali immuni al virus influenzale, MCMV ha scatenato un infiltrato linfocitario ben più consistente rispetto a quello osservato nei topi non immuni, con un drastico incremento del BALT. Sempre nei topi immuni al virus dell'influenza A, LCMV ha prodotto infiltrati di mononucleati attorno alle vie aeree più importanti di quelli osservati nel topo mai immunizzato colpito con lo stesso virus, seppur con effetti meno massicci rispetto al LCMV (393). Attraverso un altro complesso lavoro, sono stati chiariti alcuni aspetti della generazione e del mantenimento dell'iBALT (386). In tale studio, si sono investigate le relazioni tra le cellule dendritiche polmonari e l'iBALT in un modello murino di influenza. Ne è risultato che le cellule dendritiche $CD11c^+$, riscontrate nell'iBALT dopo la risoluzione dell'infezione, hanno un ruolo primario nell'organizzazione istologica e nel mantenimento dell'iBALT dopo la guarigione dalla patologia. Tali cellule dendritiche mantengono nel tempo l'architettura dell'iBALT non tramite una stimolazione antigenica, essendo il virus debellato, ma secernendo LTβ e chemochine omeostatiche. Questo studio pone inoltre in risalto l'importante funzione dell'iBALT nelle risposte umorali sistemiche contro l'influenza (386). Analisi istologiche di granulomi tubercolari in campioni polmonari umani hanno rivelato la presenza, ai margini dei granulomi, di infiltrati comprendenti APC e cellule B e T arrangiate in strutture follicolari analoghe al BALT (394). In un guscio più interno in prossimità del centro necrotico, sono stati identificati, accanto alle cellule epitelioidi, linfociti T della memoria $CD4^+$ e $CD45RO^+$. I linfociti T $CD8^+$ risultavano invece ben più rappresentati nell'infiltrato esteriore (394). Nei polmoni dei pazienti affetti fibrosi polmonare idiopatica si è riscontrata la formazione di BALT (380). Indagini istologiche e immunoistochimiche hanno permesso di rilevare in alcuni casi aggregati di linfociti B e T organizzati in follicoli e zone parafollicolari (395). Si osservavano anche cellule follicolari dendritiche e cellule dendritiche, con espressione locale di chemochine e relativi recettori. Tali tessuti linfoidi erano inoltre provvisti di venule ad endotelio alto. In tutti i casi si riscontravano anche aggregati di soli linfociti T e cellule dendritiche (395). Data la funzione di promozione delle risposte immunitarie esercitata dal BALT, ci si potrebbe aspettare un effetto positivo del BALT nei carcinomi polmonari (380). In un modello murino di melanoma B16, la somministrazione di una proteina di fusione tra un anticorpo contro il tumore e la LTα ha condotto ad una notevole riduzione

delle metastasi polmonari e dei tumori sottocutanei rispetto al controllo, con l'eradicazione delle metastasi polmonari alle più alte dosi di trattamento in caso di un avvio precoce della terapia (396). Campioni di tessuti prelevati dai gruppi di trattamento e controllo sono stati confrontati medianti esami immunoistochimici e istologici. Gli infiltrati infiammatori nei tumori degli animali di controllo erano formati prevalentemente da cellule NK, mentre nei topi trattati gli infiltrati erano caratterizzati da linfociti T $CD4^+$ distribuiti uniformemente nei tumori, con cellule T $CD8^+$ concentrate alla periferia. Con il tempo, tali aggregati assumevano un'architettura analoga ad un linfonodo, con cellule B organizzate in follicoli in sede peritumorale e segregazione fra aree T e B. I tumori degli animali trattati esibivano inoltre venule ad endotelio alto (396). Anni dopo, lo stesso gruppo di ricerca ha ripetuto l'esperimento in topi $LT\alpha^{-/-}$, privi di linfonodi, rilevando in questi ultimi dei riscontri sovrapponibili a quelli degli animali *wt* del precedente studio (397). Gli Autori deducevano quindi che l'effetto antitumorale dell'immunocitochina esaminata consisteva nell'attivazione locale delle risposte antitumorali (397). Analizzando campioni istologici di polmone di quattro pazienti affetti da carcinomi polmonari, il BALT è stato rinvenuto in uno solo di questi casi, dimostrando che il BALT non è onnipresente nei tumori polmonari (382).

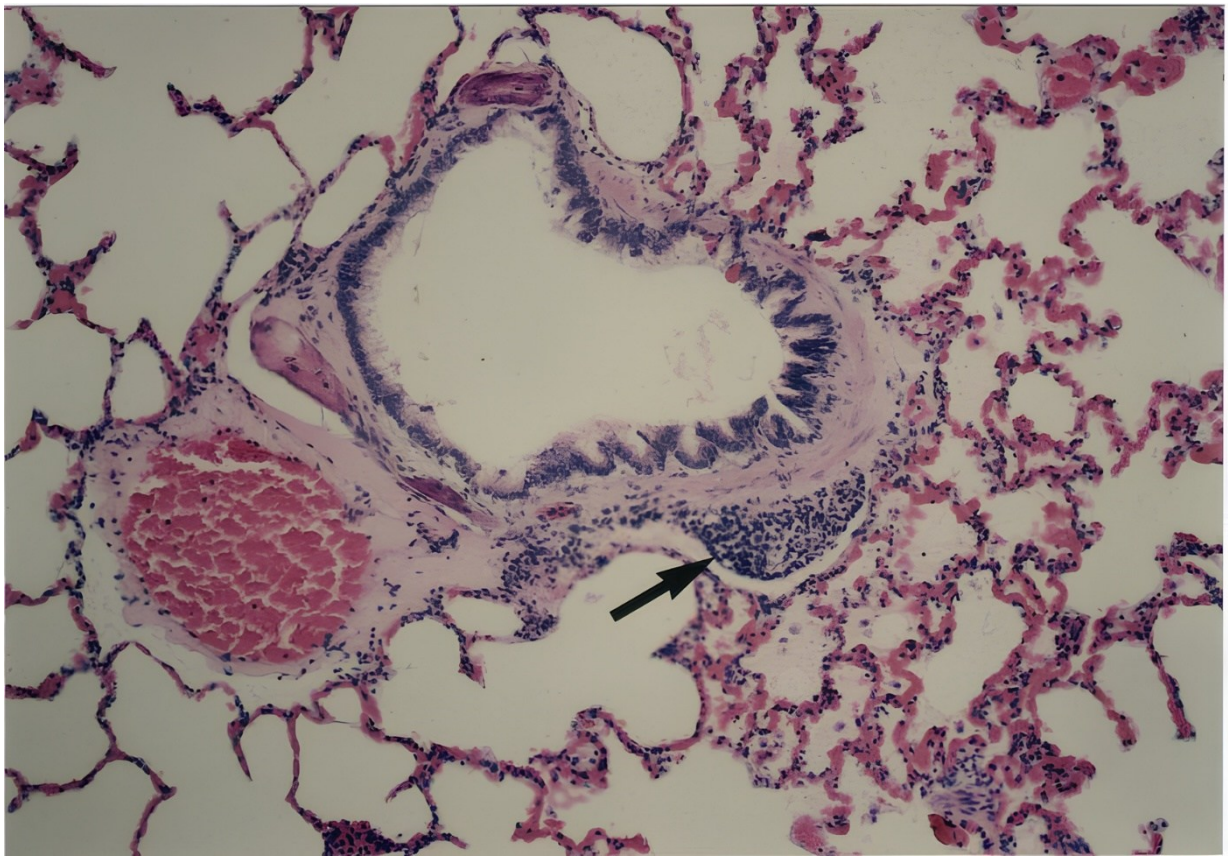

Figura 36. Tessuto linfoide associato ai bronchi (398)**.** Sezione istologica di polmone di ornitorinco in cui si notano un bronco e un vaso sanguigno affiancati, entrambi visibili in sezione trasversale, circondati da spazi aerei. La **freccia nera** segnala un aggregato di linfociti nelle immediate adiacenze della parete bronchiale.

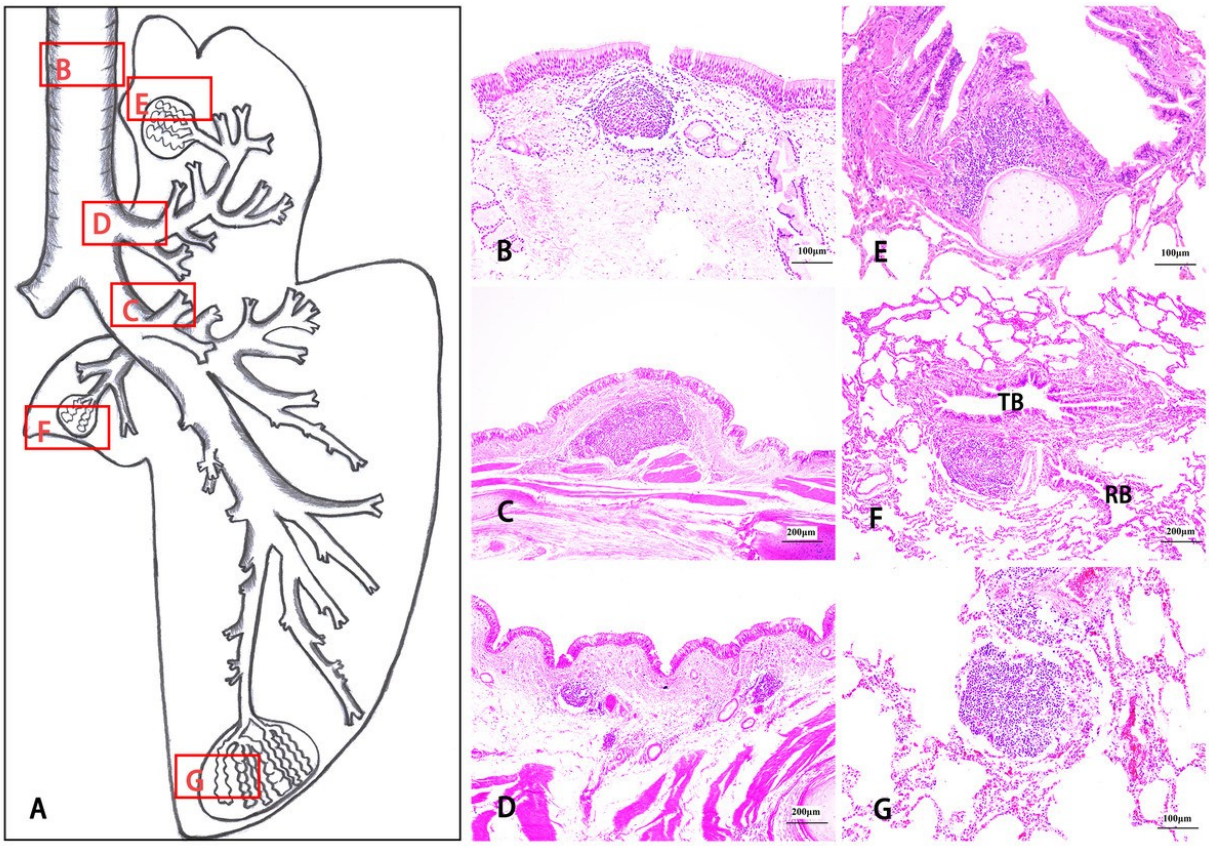

Figura 37. Follicoli linfoidi isolati rinvenuti in uno studio istologico su polmone di cammello (399)**. A**) Mappa della disposizione dei vari preparati istologici visibili a **destra** nel polmone. **B**) Follicolo linfoide nella sottomucosa della trachea. **C**) Follicolo linfoide nella sottomucosa di un bronco del lobo caudale. **D**) Follicoli linfoidi nella sottomucosa di un bronco del lobo craniale. **E**) Follicolo linfoide nella lamina propria di un bronchiolo del lobo craniale. **F**) Follicolo linfoide compreso tra un bronchiolo terminale (**TB**) e un bronchiolo respiratorio (**RB**) del lobo accessorio. **G**) Follicolo linfoide nel mesenchima polmonare, lobo caudale.

Tessuto linfoide associato al nasofaringe (NALT)

Il tessuto linfoide associato al nasofaringe (NALT) è stato studiato in minor misura rispetto al GALT e al BALT (377). Nel topo, nel ratto e nel criceto, il NALT consiste in un paio di aggregati linfoidi situati al di sopra del palato molle, all'ingresso del dotto faringeo. I due aggregati, di forma cilindrica, sono separati dal setto nasale, il quale suddivide medialmente il dotto faringeo, e il loro asse è orientato parallelamente al setto nasale (377,400,401). Il NALT è ricoperto sia da epitelio ciliato e cellule mucipare caliciformi sia da epitelio associato ai follicoli con cellule M (377,400–402). L'epitelio sovrastante il NALT contiene linfociti intraepiteliali (403). Il NALT è un organo linfoide secondario, ed è organizzato in follicoli di cellule B e zone parafollicolari abitate da cellule T (377). Nel ratto, i follicoli ospitano cellule B IgD^+, e nei centri germinativi si trovano linfociti B IgA^+ e alcune cellule B $IgG2b^+$ (404). Analisi dell'espressione di citochine nel NALT murino hanno riportato come la maggioranza delle cellule T del NALT manifestino il fenotipo Th0 (405). Tali linfociti T sono pilotati verso il fenotipo Th1 o Th2 a seconda dell'agente patogeno che ne scatena l'attivazione (405–407). Nei passaggi nasali murini, considerati un sito effettore dell'immunità mucosale, si riscontrano linfociti T $CD4^+$ orientati in senso Th2 a livello trascrizionale, essendo essi programmati per esprimere citochine Th2 (405). Il 95% dei linfociti T del NALT murino possiedono un fenotipo $TCR\alpha\beta^+$, mentre il restante 5% è $TCR\gamma\delta^+$. La situazione è diversa per i linfociti T dei passaggi

nasali, ove si riscontra una percentuale maggiore di cellule TCRγδ$^+$ (405). Il NALT presenta inoltre cellule dendritiche e macrofagi CD11b$^+$Ia$^+$ (408,409). Nelle venule ad endotelio alto del NALT murino, le cellule endoteliali esprimono MAdCAM-1, sebbene con minore frequenza rispetto alle cellule endoteliali delle venule ad endotelio alto delle placche di Peyer. Inoltre, tutte le cellule endoteliali del NALT esprimenti MAdCAM-1 co-esprimono PNAd, ma esistono anche cellule endoteliali esprimenti PNAd e non MAdCAM-1 (410). Il NALT è sede di induzione di risposte immunitarie B e T. In alcuni studi, la somministrazione intranasale di antigeni nel topo conduce alla formazione di plasmacellule secernenti IgA, IgM e IgG nel NALT ma non in altri tessuti linfoidi associati alle mucose, con la comparsa di IgG sieriche antigene-specifiche e di IgA antigene-specifiche nelle secrezioni nasali (408,411). Nei tempi successivi all'immunizzazione intranasale murina, cellule B secernenti IgG1 specifiche per l'antigene compaiono nei linfonodi cervicali posteriori e nella milza. Si ritiene dunque che i linfociti B si attivino e proliferino nel NALT in risposta ad un antigene locale, e che successivamente essi migrino nei linfonodi cervicali posteriori, e da qui alla milza (411). In un altro studio nei topi, l'immunizzazione intranasale contro l'*Hemophilus influenzae* ha portato alla comparsa di IgA specifiche per l'antigene non solo nel secreto nasale, ma pure nella saliva e nel fluido broncoalveolare (412). In piena compatibilità con i precedenti studi, si evidenziavano anche titoli di IgG sieriche. Inoltre, si registrava la comparsa di cellule secernenti IgA e IgG nei polmoni e di sole cellule secernenti IgA nella milza. Il profilo di citochine evidenziato nell'immunizzazione intranasale suggeriva sia risposte Th1 sia Th2 (412). Esperimenti di immunizzazione intranasale contro il SIV sono stati eseguiti nei macachi, con un vaccino costituito dalla proteina p55 del SIV (413). In seguito all'inoculazione intranasale del vaccino si è registrato un aumento delle IgA e delle IgG sieriche, delle IgA nelle secrezioni rettali, vaginali e nella saliva e di IgG vaginali contro p55. Sono state inoltre riscontrate cellule producenti anticorpi specifici per p55 nel sangue, nella lamina propria dell'intestino tenue, nelle tonsille, nel nasofaringe, nelle ghiandole sottomandibolari, nella cervice uterina, nei linfonodi mesenterici e nella milza di due macachi sacrificati, indicando che gli anticorpi non accedono alle secrezioni dal circolo sistemico, ma vengono piuttosto secreti dai tessuti linfoidi associati alle mucose, implicando un traffico di linfociti B dal NALT agli altri distretti del MALT. Si sono inoltre verificate risposte proliferative dei linfociti T nei vari tessuti esaminati. L'analisi delle citochine ha evidenziato una differenziazione Th1 in tutti i siti mucosali e sistemici, mentre citochine indicative di un'attività Th2 sono state identificate solo nella cervice uterina, nella lamina propria intestinale, nei linfonodi mesenterici e nella milza. Linfociti T citotossici sono stati identificati nel sangue periferico e in alcuni dei reperti autoptici, tra cui tonsille e milza, ma dimostravano scarsa attività citolitica (413). In un modello murino si è condotta un'infezione intranasale con uno streptococco del gruppo A (GAS) esprimente ovalbumina in superficie (OVA+ GAS) (414). Prima di effettuare l'inoculo del batterio, si è proceduto a trasferire nei topi dei linfociti T transgenici DO11.10, specifici per OVA+ GAS. Nei primi giorni successivi all'infezione si è osservata una notevole espansione dei linfociti T DO11.10 nel NALT. In seguito, si è notata una progressiva deplezione di tali cellule T nel NALT e una loro contestuale proliferazione nei linfonodi e nella milza, sebbene meno massiccia rispetto a quella rilevata inizialmente nel NALT. Sulla base dell'assunto che raramente il GAS si diffonde ai linfonodi e alla milza alle dosi impiegate nell'esperimento, e ciò è stato inoltre verificato prima dello studio principale, la deplezione di linfociti T DO11.10 nel NALT dopo l'iniziale espansione si spiega con il riconoscimento degli antigeni del GAS da parte di altre cellule T ivi presenti e con la migrazione di parte dei linfociti T transgenici nei linfonodi e nella milza. Il NALT agisce dunque come sito induttivo (414). Il NALT è inoltre sede di induzione della tolleranza immunologica ad antigeni introdotti per via intranasale, la quale è generalmente associata a risposte di tipo Th2 (415,416). Tuttavia, essendo che la

soppressione delle risposte Th2 non abolisce l'insorgenza di tolleranza ad antigeni intranasali nel topo, se ne deve concludere che le reazioni Th2 sono un effetto addizionale o una conseguenza della tolleranza, escludendo che esse siano la causa della tolleranza o un presupposto affinché essa si generi (417). Tramite un altro modello murino si è dimostrato che i linfonodi cervicali superificiali e i linfonodi giugulari interni, drenanti le mucose nasali, sono essenziali per la formazione della tolleranza, in quanto la loro asportazione chirurgica ha reso impossibile lo sviluppo di tolleranza ad un antigene intranasale (418). Anche la sostituzione chirurgica dei linfonodi cervicali superficiali e giugulari interni con linfonodi periferici di un altro animale ha compromesso la generazione di tolleranza agli antigeni intranasali, ma quest'ultima non è risulta intaccata quando i linfonodi cervicali superficiali e giugulari interni sono stati sostituiti con i corrispondenti di un topo donatore. In conclusione, i linfonodi cervicali superficiali e giugulari interni murini rappresentano un ambiente indispensabile e insostituibile per l'induzione della tolleranza ad antigeni inoculati per via intranasale (418). Nel ratto, i vasi linfatici efferenti che si originano nel NALT drenano nei linfonodi cervicali superficiali, i quali convogliano a loro volta la linfa nei linfonodi cervicali posteriori (419).

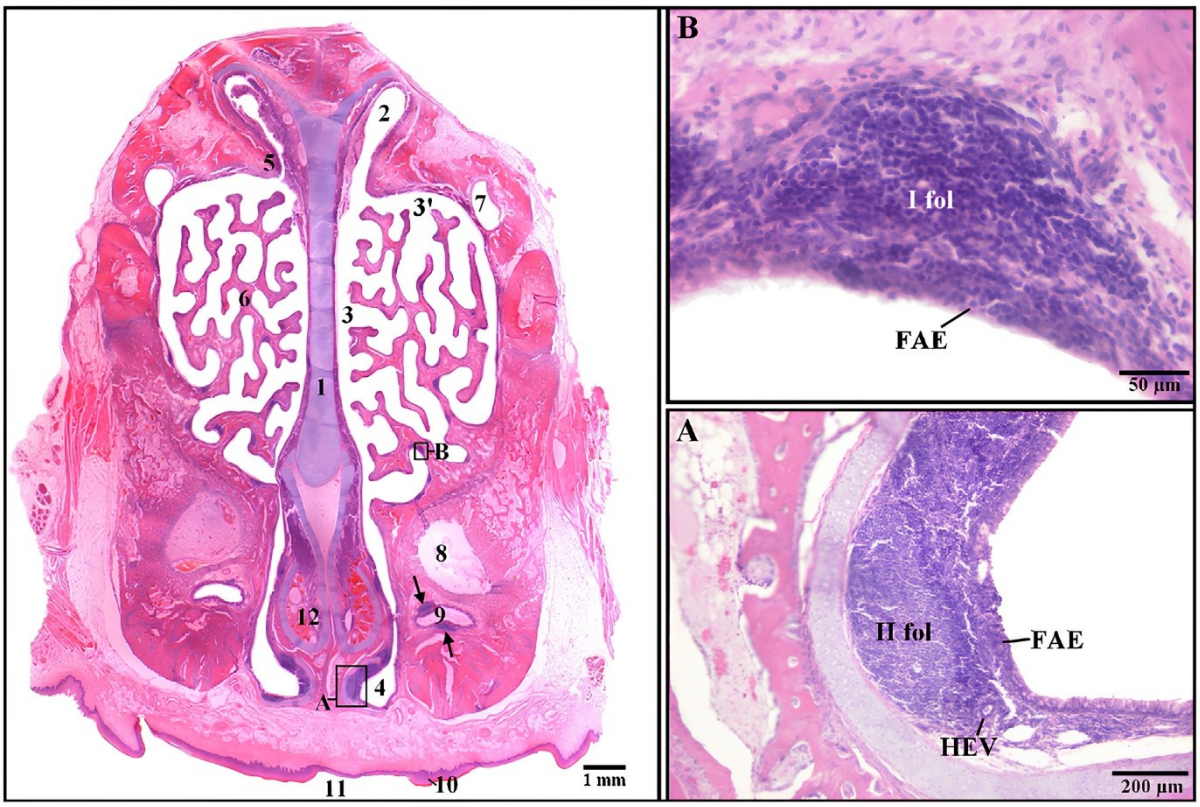

Figura 38. Sezione istologica sagittale di cavità nasale decalcificata di coniglio (420)**.** A **sinistra**, preparato intero. **1**) Setto nasale. **2**) Meato nasale dorsale. **3**) Meato nasale comune. **4**) Meato nasale ventrale. **6**) Conca nasale ventrale. **9**) Dotto lacrimale con tessuto linfoide associato al dotto lacrimale (LDALT) (**frecce**). **A**) Follicolo linfoide, ingrandito nell'immagine in **basso a destra**, comprendente un centro germinativo. La relativa zona mantellare confina con la regione sottoepiteliale a cupola. Una venula ad endotelio alto (**HEV**) si osserva in sezione trasversale. **B**) Follicolo linfoide primario, ingrandito nell'immagine in **alto a destra**, con il dettaglio dell'epitelio associato al follicolo (**FAE**).

Uso dei probiotici per via intranasale in modelli murini

Avendo affrontato l'istologia e le risposte immunitarie del NALT, si riporta ora uno studio in un modello murino in cui si sono valutati gli effetti adiuvanti di probiotici su vaccinazioni

intranasali anti-pneumococco (421). In tale studio si è impiegato *Lactococcus lactis* ricombinato con la proteina protettiva pneumococcica A (PppA), vivo oppure inattivato. Il probiotico somministrato è stato *Lactobacillus casei* LCR 431. Gli animali sono stati inizialmente suddivisi in due gruppi, uno assegnato al vaccino vivo e l'altro a quello inattivato, entrambi somministrati per via intranasale. Prima dell'inoculo del vaccino, alcuni dei topi destinati al vaccino vivo sono stati trattati con il probiotico per via orale (LL + Lc (O)), mantenendo senza probiotico i restanti a vaccino vivo (LL). Allo stesso tempo, ad alcuni animali assegnati al vaccino inattivato è stato somministrato il probiotico per via intranasale (D-LL + Lc (N)) oppure per via orale (D-LL + Lc (O)), lasciandone altri senza probiotico (D-LL). Per il gruppo D-LL + Lc (N) si sono registrati i titoli più elevati di IgA secretorie nei lavaggi broncoalveolari, anche se senza differenze significative rispetto ai gruppi D-LL + Lc (O) e LL + Lc (O). Riguardo ai titoli anticorpali del siero, il gruppo D-LL + Lc (N) ha mostrato un aumento significativo dei titoli di IgG rispetto a LL e dei titoli di IgM rispetto a LL e a LL + Lc (O). Non si è osservata invece alcuna variazione significativa dei titoli di IgA tra i vari gruppi. Nei gruppi trattati con il probiotico, i profili di citochine Th1 e Th2 sono risultati significativamente differenti rispetto ai gruppi sottoposti alla sola vaccinazione; anche a parità di vaccino, la via di somministrazione del probiotico ha avuto un influsso evidente sui profili di citochine (421). In un altro modello murino, si è valutato l'effetto protettivo della somministrazione intranasale ripetuta di *L. lactis* contro una successiva infezione da *S. pneumoniae* del sierotipo 14 (422). Nei trattamenti più prolungati, *L. lactis* si è rivelato in grado di ridurre la colonizzazione polmonare da parte di *S. pneumoniae* e di potenziare l'immunità innata e adattativa dell'apparato respiratorio; si è riscontrato un incremento dei neutrofili e dei linfociti, ma non dei macrofagi alveolari, dopo l'infezione rispetto al controllo. Anche i titoli di IgA e IgG anti-pneumococco nel siero e nel lavaggio broncoalveolare sono aumentati. Inoltre, *L. lactis* ha ridotto i danni polmonari causati da *S. pneumoniae*: mentre per i controlli si sono osservati massicci infiltrati infiammatori polmonari con grave interessamento parenchimale, compromissione degli spazi alveolari ed emorragie, un gruppo trattato per 5 giorni con *L. lactis* ha manifestato infiammazione modesta, con assenza di emorragie e di interessamento degli spazi alveolari e con un contestuale aumento dei linfociti nel BALT (422).

NALT nell'uomo

Il NALT è stato investigato nella specie umana in modo alquanto limitato, in parte probabilmente a causa delle difficoltà di reperimento e di preparazione dei necessari reperti istologici. Tuttavia, attraverso uno studio sui cadaveri di 150 bambini si è cercato di far luce sulle caratteristiche anatomiche e istologiche del NALT umano (423). Adoperando una sega oscillante si è accuratamente isolato dal massiccio facciale un blocco di tessuto che comprendesse le cavità nasali. Il NALT è stato identificato nel 38% dei casi esaminati, ove è stato individuato in prossimità delle coane, ma principalmente nelle regioni ventrali dei turbinati. Gli esami istologici hanno permesso di rintracciare in tali aggregati sottomucosali un'organizzazione in follicoli talora dotati di centri germinativi, con infiltrazione di linfociti intraepiteliali nella sovrastante mucosa e venule ad endotelio alto. La distribuzione anatomica dei follicoli linfoidi si è rivelata sparsa e inoltre piuttosto disomogenea tra i diversi casi in cui il NALT è stato rinvenuto, in pieno contrasto con l'uniforme e circoscritta collocazione topografica del NALT nei roditori. Il NALT è comunque risultato più frequente nel turbinato medio. Talvolta è stata osservata una distribuzione "a collana" dei follicoli linfoidi, somigliante a quella delle placche di Peyer. La presenza e la frequenza del NALT non è apparsa essere correlata alla causa di morte né ai livelli di infiammazione, infatti si sono anche notate scarse

quantità di NALT in casi di polmonite, a fronte invece di un NALT più abbondante, prominente e sviluppato in decessi di natura traumatica (423).

Tessuto linfoide associato all'apparato digerente (GALT)

Il tessuto linfoide associato all'apparato digerente (GALT) è un'organizzazione di tessuti linfoidi situati subito al di sotto delle mucose dell'apparato digerente (424). Nell'uomo, il GALT è maggiormente rappresentato nelle placche di Peyer (424,425). Nell'uomo e nel topo, il GALT include tessuti linfoidi multifollicolari, come le placche di Peyer dell'intestino tenue, e i follicoli linfoidi isolati, distribuiti nell'intera lunghezza dell'intestino tenue e dell'intestino crasso (426). Il GALT include inoltre alcuni tessuti caratteristici solo di alcune specie di mammiferi (426); tra di essi figurano l'appendice vermiforme nel coniglio (427) e nell'uomo (426), le criptoplacche nel topo (428), le placche cecali e coliche nel topo (429,430), e la tonsilla rettale, raramente descritta nell'uomo (431).

Criptoplacche

Scoperte al termine del XX^ secolo, le criptoplacche sono aggregati dalla forma "a barile" comprendenti linfociti finemente stipati, osservabili nella lamina propria delle cripte di Lieberkuhn dell'intestino tenue e del crasso (428). Non sono invece presenti nello stomaco. Nel topo, le criptoplacche compaiono nel tratto digerente alla seconda settimana dopo la nascita, ossia all'inizio dello svezzamento (428). Non sono state invece riscontrate criptoplacche o strutture ad esse assimilabili nell'uomo, nel suino e nel ratto (432). Le criptoplacche presentano un'architettura uniforme, senza segregazione dei linfociti aree B e T, e in esse si evidenzia la presenza di cellule dendritiche. Le iniziali indagini immunoistochimiche su questi tessuti hanno evidenziato che larga parte delle cellule delle criptoplacche del digiuno, dell'ileo e del colon esprimono c-kit e il recettore dell'interleuchina 7, IL-7R (428). Manifestando marcatori tipici dei timociti in sviluppo, si è ipotizzato che le criptoplacche rappresentino siti di maturazione extratimica dei linfociti intraepiteliali (428,433). A supporto di questa tesi, topi *knockout* per IL-7 o IL-7R sono privi di linfociti T γδ, con una deplezione di criptoplacche, mentre l'espressione di IL-7 limitata ai soli enterociti dei topi IL-$7^{-/-}$ porta al recupero delle criptoplacche e dei linfociti T γδ, anche se esclusivamente di quelli intraepiteliali (434). Inoltre, in un esperimento in cui cellule c-kit^{+} prive di marcatori di lignaggio estratte dalle criptoplacche di topi privi di timo sono state infuse per via endovenosa in topi immunodepressi, questi ultimi hanno sviluppato linfociti T intraepiteliali TCR$\alpha\beta^{+}$ e TCR$\gamma\delta^{+}$, oltre a linfociti T TCR$\alpha\beta^{+}$ nei linfonodi mesenterici, nel timo e nella milza (435). Tuttavia, un altro studio sulla materia ha ricondotto al timo l'origine dei linfociti T intraepiteliali intestinali TCR$\alpha\beta^{+}$, escludendo per questi ultimi una derivazione extratimica (436). D'altro canto, comunque, si è anche scoperto che il timo, oltre a rilasciare linfociti T maturi, è in grado di esportare precursori TN2 e TN3 (437). Tali timociti colonizzano il timo stesso e l'intestino, ove si organizzano in criptoplacche. Ultimando il processo di maturazione in queste strutture del GALT, i timociti originano linfociti T intraepiteliali CD8$\alpha\alpha^{+}$ (437).

Follicoli linfoidi isolati

Malgrado essi siano caratterizzati da dimensioni ben minori rispetto alle placche di Peyer e agli aggregati linfoidi dell'appendice, i follicoli linfoidi isolati rappresentano collettivamente un'importante componente del GALT umano, particolarmente in relazione al loro elevato numero (426). Ad esempio, la loro densità di distribuzione si aggira infatti sui 15 per cm^2 nel colon, arrivando a 25-26 per cm^2 nel retto (438). I follicoli linfoidi isolati decorano la totalità della lunghezza dell'intestino, seppur con densità di distribuzione diverse tra i vari segmenti, come si può anche già desumere dai dati appena riportati (426,438). Nel topo, i follicoli linfoidi isolati si evolvono a partire dalle criptoplacche grazie a segnali da parte di ligandi del recettore AhR (*Aryl-hydrocarbon Receptor*), espresso dalle cellule linfoidi innate RORγt$^+$ (439). Sull'organogenesi dei follicoli linfoidi isolati influiscono inoltre metaboliti rilasciati dal microbiota, i quali intervengono in tale ambito anche mediante la modulazione dell'espressione intestinale di citochine (440–442). I meccanismi di sviluppo dei follicoli linfoidi isolati differiscono tra l'intestino tenue e il colon: il microbiota induce la formazione dei follicoli linfoidi isolati nell'intestino tenue, reprimendola invece nel colon (441). Difatti, topi *germ-free* manifestano follicoli linfoidi isolati nel colon, ma non nel tenue (441). Nella specie umana, i follicoli linfoidi isolati sono presenti a tutte le età, ma al di sotto dei due anni essi si organizzano in strutture multifollicolari, manifestandosi invece separati e distanziati nei bambini più grandi e negli adulti (443). Dal punto di vista anatomico, sono stati distinti follicoli linfoidi isolati residenti nella lamina propria della mucosa intestinale, chiamati M-ILF (*Mucosal - Isolated Lymphoid Follicles*), e altri che si collocano nella sottomucosa, pur estendendosi attraverso la muscularis mucosae fino al sovrastante epitelio; questi ultimi vengono pertanto definiti SM-ILF (*SubMucosal - Isolate Lymphoid Follicles*) (444). A prescindere da tale distinzione istologica, i follicoli linfoidi isolati umani sono sovrastati da un epitelio associato ai follicoli comprendente cellule M. Gli SM-ILF comprendono un'area centrale di cellule B circondata da uno strato di cellule T; tra il tessuto linfoide e l'epitelio associato al follicolo si trova una regione sottoepiteliale a cupola ricca di cellule CD11c$^+$. Nell'intestino crasso umano, gli SM-ISF sono presenti ad una frequenza uniforme dal cieco sino al retto, essendo invece più scarsi nell'ileo. Gli M-ISF sono di dimensioni più ristrette rispetto agli SM-ISF, sebbene siano anch'essi dotati di un follicolo interno di linfociti B racchiuso da un'area T esteriore e di una regione sottoepiteliale a cupola con cellule CD11c$^+$. L'estensione anatomica degli M-ISF, a differenza degli SM-ISF, è confinata alla lamina propria intestinale, senza attraversamento della *muscularis mucosae*. Anche la distribuzione degli M-ISF è difforme da quella degli SM-CSF: gli M-ISF sono più concentrati nell'ileo e nel colon distale e meno rappresentati nel colon prossimale. La composizione della lamina propria intestinale e dei tessuti del GALT umani in termine di cellule linfoidi è stata esaminata. Nei follicoli linfoidi isolati umani si riscontrano linfociti B vergini (IgD$^+$CD19$^+$CD20$^+$) e linfociti T vergini (CD45RA$^+$CCR7$^+$CD3$^+$), ma non plasmacellule, che si localizzano invece nelle regioni della lamina propria intestinale prive di follicoli. Questo riscontro suggerisce un ruolo dei follicoli linfoidi isolati quale sito induttivo delle risposte adattative. Rispetto alla circostante lamina propria, i follicoli linfoidi isolati mostrano più elevate proporzioni di linfociti T CD4$^+$. Le cellule T CD4$^+$ della memoria centrale sono più rappresentate nei follicoli linfoidi isolati rispetto alla lamina propria, la quale mostra invece più elevate proporzioni di linfociti T CD4$^+$ effettori e della memoria effettori. Alquanto simile è la distribuzione delle cellule T CD8$^+$, ma con un aspetto peculiare da evidenziare: i linfociti T CD8$^+$ effettori della memoria predominano in tutti i tessuti analizzati, con l'eccezione degli SM-ISF; questi aggregati mostrano invero percentuali di queste cellule inferiori rispetto alla circostante lamina propria e ad altre forme di GALT, con proporzioni di linfociti T CD8$^+$ della memoria effettori che tendono a pareggiare quelle dei linfociti T CD8$^+$ negli SM-ISF (444). Le

aree T dei follicoli linfoidi isolati umani contengono venule ad endotelio alto esprimenti MAdCAM-1, e una rete di vasi linfatici efferenti circonda sia SM-ILF sia M-ILF (444). I follicoli linfoidi isolati sono stati studiati anche nel topo (445). Nel topo BALB/c, i follicoli linfoidi isolati sono stati rilevati a partire dal settimo giorno dopo la nascita, ma non prima. I follicoli linfoidi isolati si collocano in tandem sul lato antimesenterico dell'intestino tenue dei topi BALB/c, DBA/2J/Jcl e C3H/HeN/Jcl (445). Pur essendo più voluminosi rispetto alle criptoplacche, i follicoli linfoidi isolati si riscontrano in numero minore rispetto a quest'ultime. I follicoli linfoidi isolati occupano la lamina propria delle cripte e dei villi, contrariamente alle criptoplacche, le quali, pur manifestando una distribuzione topografica uniforme, alloggiano solo in corrispondenza delle cripte. I villi intestinali contenenti un follicolo linfoide isolato si mostrano leggermente abbassati e aumentati in diametro rispetto ai circostanti privi di follicoli. L'area centrale del follicolo, popolata da linfociti B, è circondata da un fine strato di cellule c-kit^{+} e IL-R7α^{+}. In tale mantello periferico sono inoltre disperse cellule dendritiche CD11c+. I follicoli ospitano anche un esiguo numero di cellule T CD3+. La formazione di centri germinativi nelle aree B delle placche di Peyer dei follicoli linfoidi isolati murini appare ben evidente, ed è ben più frequente rispetto a quella osservata nei linfonodi mesenterici e nella milza. Ciò è presumibilmente dovuto alla costante esposizione del GALT agli antigeni luminali del tratto digerente. L'area B dei follicoli linfoidi isolati murini contiene popolazioni di cellule IgM^{+} e altre di cellule secernenti IgA (445). I topi a fenotipo LTα$^{-/-}$ non presentano follicoli linfoidi isolati (445,446), mentre una forte deplezione di questi aggregati linfoidi è un tratto caratteristico dei topi IL-7Rα$^{-/-}$ (445). Una delle differenze più evidenti tra i follicoli linfoidi isolati umani e quelli murini è rappresentata dalle proporzioni dei linfociti B e T: nei follicoli linfoidi isolati murini l'area B costituisce la componente preponderante del follicolo, mentre nell'uomo i linfociti T si trovano in quantità ben superiori rispetto alle cellule B (444).

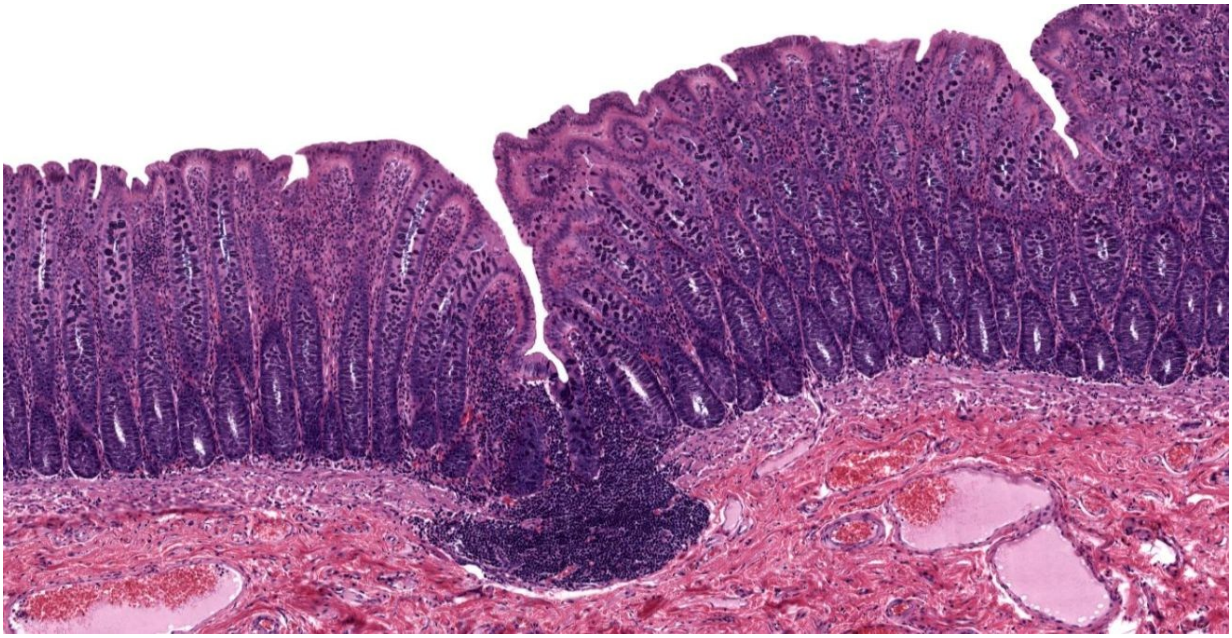

Figura 39. Follicolo linfoide isolato (447)**.** Particolare di un preparato della parete del colon in cui si visualizzano la mucosa e parte dello spessore della sottomucosa. Al centro dell'immagine appare ben evidente un follicolo linfoide isolato, disposto tra la sottomucosa e la lamina propria.

Placche di Peyer

Le placche di Peyer sono aggregati di follicoli linfoidi presenti nell'intestino tenue. Nell'uomo, le placche di Peyer raggruppano decine o centinaia di follicoli linfoidi ciascuna, e si dispongono sul bordo antimesenterico dell'intestino tenue (426). La concentrazione delle placche di Peyer raggiunge il proprio massimo nell'ultimo tratto, indicativamente di 10-15 cm, dell'ileo distale, in prossimità della valvola ileocecale (425,448). In tale segmento, le placche di Peyer non sono confinate al solo bordo antimesenterico, ma si estendono anche a quello mesenterico e nelle regioni che separano i due bordi, formando un anello linfoide incompleto (425,448). Simili disposizioni anulari possono talora essere osservate anche nel duodeno e nel digiuno prossimale (425). Nell'uomo, l'istogenesi delle placche di Peyer avviene durante la vita intrauterina: all'11^ settimana di gestazione si possono osservare aggregati di macrofagi nell'ileo fetale, mentre i primi aggregati linfoidi, seppur senza una segregazione di linfociti T e B, si possono talvolta manifestare alla 14^ settimana (449). Alla 16^ settimana, gli aggregati sono costantemente presenti e di maggiori dimensioni, anche se non ancora organizzati in aree B e T. Infine, alla 19^ settimana appare ben evidente la suddivisione delle aree B e T, con la comparsa delle cellule follicolari dendritiche nelle zone B e la prevalenza dei linfociti T *helper* rispetto ai citotossici nelle aree T (449). Nel topo, la formazione delle placche di Peyer comprende in vari stadi (450). Nel primo di tali stadi si ha la comparsa di un aggregato cellulare esprimente VCAM-1, inizialmente privo di linfociti e macrofagi. Successivamente appaiono cellule esprimenti IL-7R, e simultaneamente anche cellule MHC I^+. Infine, divengono riscontrabili nell'aggregato i marcatori CD3 e B220 (450). Sempre nel topo, l'apparizione delle placche di Peyer inizia nel digiuno prossimale, e prosegue gradualmente in senso aborale fino all'ileo distale (450). In piena analogia con altri tessuti del MALT, le placche di Peyer sono costituite da follicoli ed aree interfollicolari, e sono sovrastate da un epitelio associato ai follicoli (451). I follicoli delle placche di Peyer includono centri germinativi, cellule follicolari dendritiche e macrofagi. La regione sottoepiteliale a cupola, compresa tra l'aggregato e l'epitelio, contiene linfociti B e T, cellule dendritiche e macrofagi. Nelle placche di Peyer decorrono venule ad endotelio alto, mediante le quali i linfociti vergini extravasano nelle placche di Peyer (451). Sia nell'uomo sia nel topo, le venule ad endotelio alto delle placche di Peyer esprimono MAdCAM-1 (426,452,453). Anche le venule ad endotelio alto dei linfonodi mesenterici esprimono MAdCAM-1, sebbene in ragione minore rispetto a quelle del GALT (454). I linfociti vergini e attivati lasciano le placche di Peyer attraverso vasi linfatici efferenti, situati nel lato peritoneale delle placche, che le collegano ai linfonodi mesenterici (451). L'architettura follicolare delle placche di Peyer è delimitata superiormente dall'epitelio associato ai follicoli, il quale differisce spiccatamente dal circostante epitelio dei villi (451,455). Tale epitelio specializzato dimostra infatti una scarsa secrezione mucosa e una sostanziale paucità di cellule caliciformi mucipare (456,457). L'epitelio associato ai follicoli è inoltre istologicamente disomogeneo: la sua composizione include cellule M ed enterociti colonnari assorbenti (451,455–457). Le cellule M sono caratterizzate da micropliche, ossia irregolari convoluzioni, a livello della superficie luminale (455). Il glicocalice delle cellule M si presenta poco sviluppato (455–457). La superficie basolaterale delle cellule M forma una tasca in cui i linfociti e i macrofagi si possono addentrare (456,457). Le cellule M sono connesse alle cellule adiacenti attraverso desmosomi, giunzioni occludenti e interdigitazioni (455). Come precedentemente accennato, le cellule M sono in grado di legare materiale presente nel lume, inglobarlo, trasportarlo verso il lato basolaterale della cellula, e infine rilasciarlo in sede sottoepiteliale (457,458). La transcitosi da parte delle cellule M può interessare un'ampia varietà di antigeni, tra cui macromolecole, batteri, virus e protozoi che, traslocati nella regione a cupola, possono essere captati da APC ivi presenti (451,457,459,460). Invero, la regione a

cupola contiene cellule dendritiche (461–463) e macrofagi (463–465). Nelle placche di Peyer sono state identificate diverse popolazioni di cellule dendritiche, di cui le cellule dendritiche plasmacitoidi, le cellule CD8α+, CD11b+, doppio-negative, e le cellule dendritiche esprimenti il lisozima, note anche come LysoDC (466–468). Residenti nella regione sottoepiteliale a cupola, le cellule LysoDC, riescono a migrare nel lume o a estendervi prolungamenti tramite pori transcellulari delle cellule M (469). In tal modo, le LysoDC campionano direttamente gli antigeni luminali e si ritirano successivamente nella regione sottoepiteliale a cupola (469). In sintesi, tramite le cellule M il GALT riesce ad effettuare un campionamento degli antigeni presenti nel lume intestinale (426,451). Studi nel topo hanno suggerito per la regione sottoepiteliale a cupola un ruolo nell'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ e nello scambio isotipico delle cellule B verso le IgA (463,465,470). I follicoli comprendono un centro germinativo centrale, circondato da un mantello di cellule B dai contorni scarsamente definiti, il quale converge a tratti con la popolazione cellulare della regione sottoepiteliale a cupola (464). Tale congiunzione è apparsa ancor più evidente in uno studio immunoistochimico su placche di Peyer umane: la colorazione dei marcatori CD40, CD80 e CD86 delle cellule B ha indicato che l'espressione di tali molecole si estende dal centro germinativo alla regione sottoepiteliale a cupola e alle tasche delle cellule M dell'epitelio associato ai follicoli (471). Le tasche delle cellule M rappresentano pertanto un'estensione del centro germinativo (471). La zona mantellare che circonda il centro germinativo è caratterizzata da cellule esprimenti IgD e IgM in superficie (464). Nella regione che contorna il mantello si riscontrano cellule esprimenti IgA1 e IgM in superficie, le quali si addentrano nell'area T e nella regione sottoepiteliale a cupola, infiltrandosi inoltre tra le cellule del sovrastante epitelio. Occasionalmente si possono trovare anche cellule esprimenti in superficie IgG e IgA2 nelle placche di Peyer umane. Ben più eterogenea è la composizione del centro germinativo: in esso sono presenti cellule esprimenti tutti gli isotipi anticorpali ad eccezione delle IgD. Nella regione sottoepiteliale a cupola sono presenti cellule B contenenti IgA1, IgA2, IgM e IgG nel citoplasma, alcune delle quali sono plasmacellule. Le cellule B della lamina propria producono soprattutto IgA1 e IgA2 (464). La zona mantellare del follicolo è separata dall'area T da una zona marginale, la quale riporta cellule B $CD27^+IgM^+IgD^+$, fenotipicamente analoghe alle cellule della zona marginale della milza (464,472,473). Le aree T e le aree a composizione mista contengono linfociti T *helper* e citotossici, con una prevalenza delle cellule *helper* rispetto alle citotossiche (464). Tra le cellule T $CD4^+$ delle placche di Peyer umane vi sono linfociti T vergini, linfociti T della memoria centrale e linfociti T della memoria effettori, anche se le cellule T vergini sono presenti in quantità generalmente minori rispetto agli altri due stipiti (444). Riguardo alle cellule T $CD8^+$, i linfociti T della memoria effettori sono in linea di massima più numerosi delle cellule vergini e della memoria centrale (444). I linfociti T regolatori sono rilevabili in misura apprezzabile nei follicoli linfoidi isolati e nelle placche di Peyer umani, ove sono organizzati in forma di aggregati (474). I Treg sono invece molto scarsi nella lamina propria intestinale e nell'epitelio. Si è osservato la frequenza di Treg nei follicoli linfoidi isolati e nelle placche di Peyer è massima nell'infanzia, decrescendo successivamente con l'età. Al contrario, la frequenza di Treg nei follicoli linfoidi isolati del colon non è soggetta a significative variazioni nell'arco della vita. Complessivamente, comunque, la frequenza di Treg nel GALT e nei linfonodi mesenterici vede il proprio picco nell'infanzia, con una progressiva diminuzione con l'età (474).

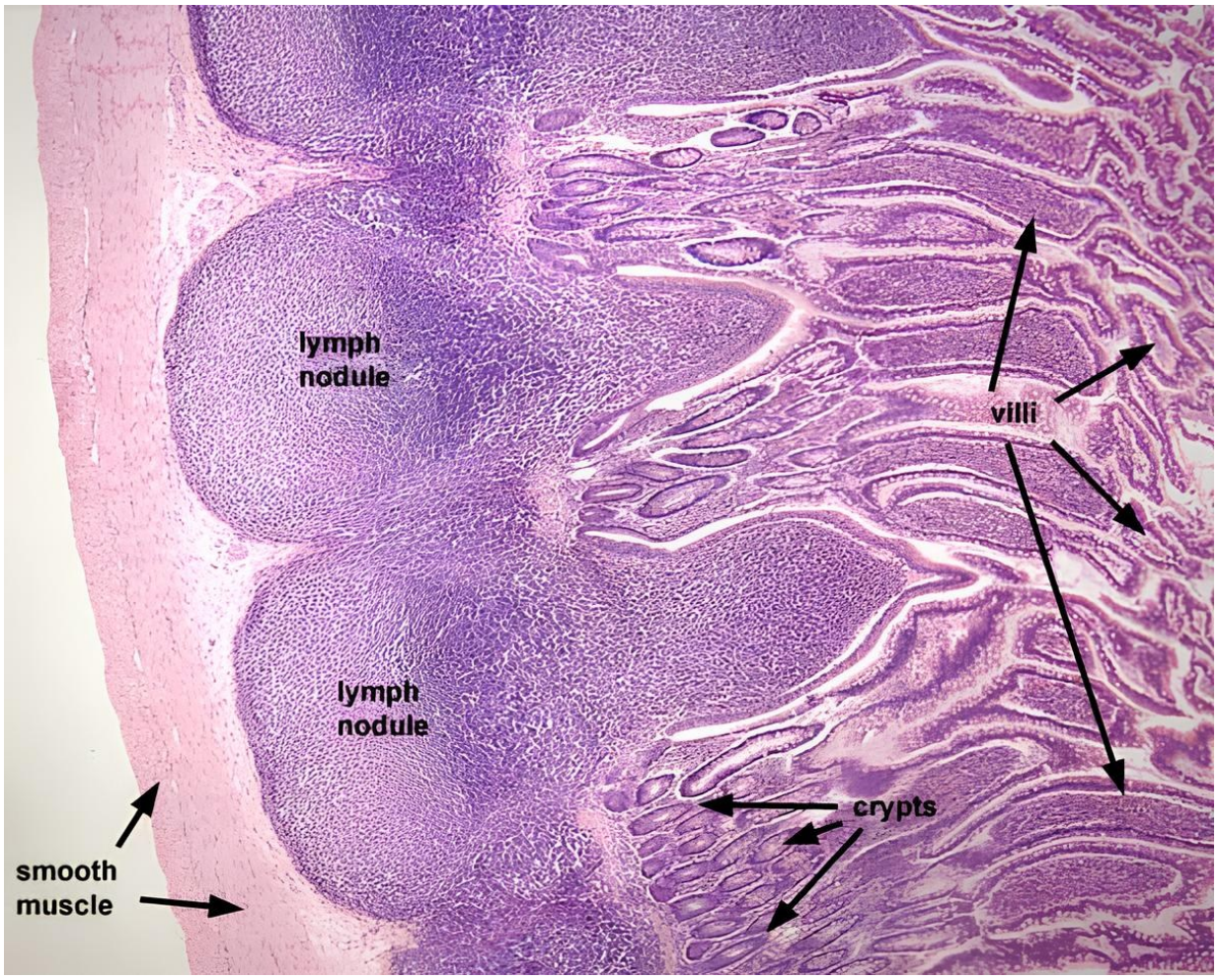

Figura 40. Placca di Peyer (475)**.** Microfotografia di una sezione di ileo non umano con il dettaglio di alcuni follicoli linfoidi di una placca di Peyer che occupano la sottomucosa. Alla destra dell'immagine appaiono i villi intestinali e le cripte di Lieberkuhn in sezione. Si osservi come l'epitelio associato ai follicoli protrude nettamente verso il lume. Ben distinguibili, per ciascuno dei follicoli, sono il centro germinativo, la regione sottoepiteliale a cupola, e la zona mantellare del follicolo, quest'ultima molto più ampia in corrispondenza della regione sottoepiteliale a cupola.

Appendice vermiforme

L'appendice vermiforme è un breve processo tubulare a fondo chiuso che si diparte dall'intestino cieco in sede dorsomediale rispetto a quest'ultimo (476). Giacente in sede intraperitoneale, l'appendice si distingue dal resto dell'intestino crasso per l'assenza di tenie, haustra, pliche semilunari e appendici epiploiche (476). Nel ratto e nel topo si è osservato che i biofilm batterici sono notevolmente più abbondanti nei tratti prossimali dell'intestino crasso, di cui il cieco, il colon ascendente e il trasverso, rispetto al colon discendente, ove i biofilm si presentano più rarefatti (477,478). Tale osservazione, ferma restando l'assenza dell'appendice in entrambi gli animali appena citati, sembra consolidare l'ipotesi che l'appendice, nelle specie in cui è riscontrabile, custodisca un "magazzino" per la conservazione di specie batteriche benefiche (479). La collocazione anatomica dell'appendice e il suo lume ristretto, del resto, mantengono i biofilm appendicolari relativamente protetti dall'attività peristaltica e dalla contaminazione da parte di agenti patogeni. L'appendice, quindi, grazie al parziale sfaldamento dei biofilm appendicolari a causa del flusso del materiale fecale dal cieco verso l'ano, potrebbe ricostituire un sano microbiota nel resto del crasso nel caso un evento patologico inducesse disbiosi (479). A tal proposito, l'appendice

sembra avere un ruolo protettivo dall'infezione ricorrente da Clostridium difficile nell'uomo (480,481). Il tessuto linfoide associato all'appendice inizia il proprio sviluppo nel corso della vita fetale: nel feto di 11,5 cm iniziano ad apparire i primi aggregati linfoidi subito al di sotto della mucosa appendicolare (482). Tali formazioni successivamente si ingrandiscono fino a protrudere nel lume appendicolare, con linfociti che si insinuano nel sovrastante epitelio a cupola (482). La parete appendicolare, istologicamente analoga a quella del colon, comprende una mucosa, una sottomucosa, una *muscularis externa* e una sierosa. Nella lamina propria si trovano macrofagi e plasmacellule. Nella mucosa si rilevano linfociti intraepiteliali, prevalentemente dello stipite T $CD8^+$ (483). Nell'epitelio associato ai follicoli appendicolari, provvisto di cellule M (484,485), i linfociti intraepiteliali si riscontrano in numero maggiore rispetto alla circostante mucosa delle cripte di Lieberkuhn (486). La sottomucosa ospita follicoli linfoidi che si estendono alla lamina propria. La zona mantellare di tali follicoli, contenente in prevalenza linfociti B, si presenta asimmetrica, estendendosi preponderantemente nell'area del follicolo più prossima al lume. L'area scura del centro germinativo è formata da centroblasti e macrofagi, mentre la zona chiara comprende i centrociti, sostenuti dalle cellule follicolari dendritiche. La regione compresa tra l'epitelio a cupola e la zona mantellare ospita una zona a cellule miste, in cui si visualizzano piccoli linfociti, ma anche cellule linfoidi dalla forma irregolare, e macrofagi. Molti linfociti di questa zona sono cellule B, ma vi sono anche linfociti T. Inoltre, tale area ospita le venule ad endotelio alto (486). Tra la zona mantellare e la circostante area T è spesso riscontrabile una zona marginale, contenente cellule B della zona marginale ($CD3^-CD27^+$) (473,487). Nell'area T, il numero di linfociti T *helper* supera ampiamente quello di cellule T citotossiche (486). Linfociti T sono individuabili anche nella zona mantellare e nel centro germinativo (486). Un altro tratto distintivo dell'appendice è la maggiore percentuale di linfociti T NK ($CD3^+$) tra i linfociti intraepiteliali rispetto al colon (488).

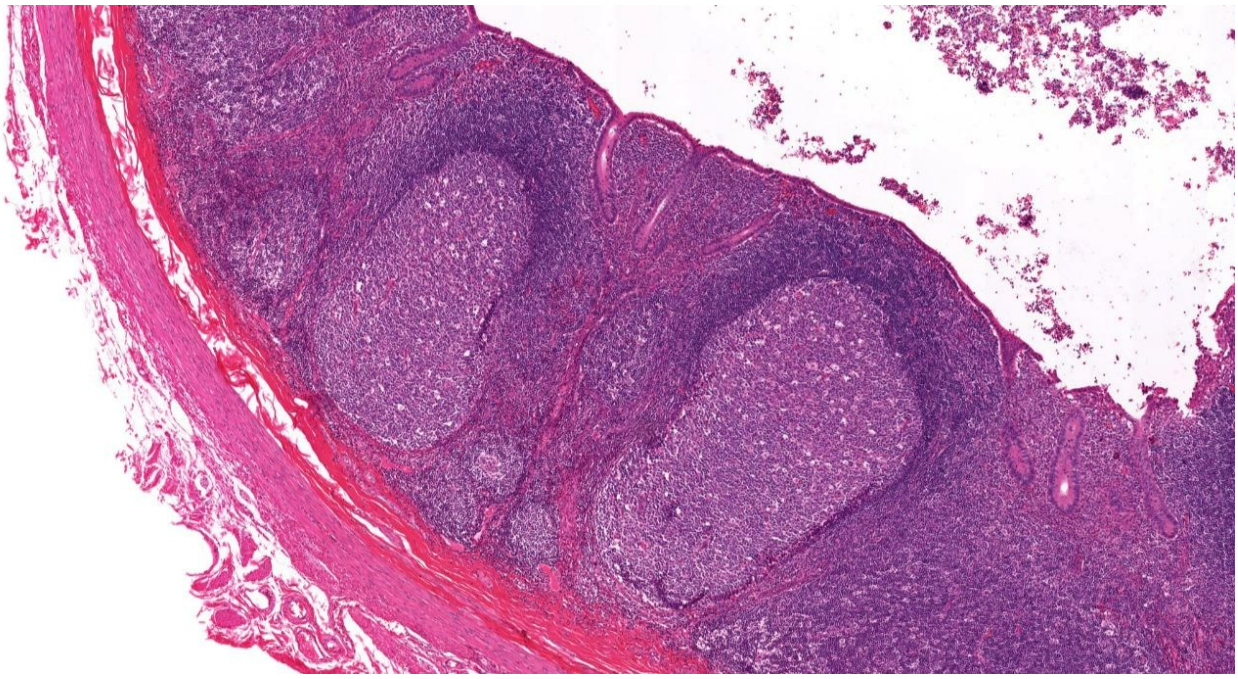

Figura 41. Tessuto linfoide appendicolare (447)**.** Sezione trasversale di appendice umana in cui si notano diversi follicoli linfoidi. Due di essi, al centro dell'immagine, esibiscono un massivo centro germinativo circondato dalla zona mantellare, nettamente più scura, la quale si fonde, nel suo lato luminale, con l'attigua regione sottoepiteliale a cupola. L'epitelio associato a tali follicoli si alterna con le cripte di Lieberkuhn. Accanto ai due massicci noduli appena descritti si riscontrano anche altri follicoli di minori dimensioni. In basso a destra appare un ampio aggregato linfoide privo di centro germinativo.

Rapporti tra il GALT e i microrganismi patogeni

Molteplici studi basati su modelli murini hanno permesso di approfondire l'importanza del GALT nell'induzione delle risposte immunitarie mucosali ad agenti microbici (489–491). In uno di questi lavori si sono generati topi privi di placche di Peyer, altri privi di follicoli linfoidi isolati, altri ancora privi di entrambi questi organi, mentre un ulteriore gruppo era privo di placche di Peyer, follicoli linfoidi isolati e linfonodi mesenterici (489). Tutti questi animali, assieme ad un gruppo di controllo sono stati immunizzati per via orale con r*Salmonella*-Tox C. La generazione di IgG specifiche per l'antigene e delle relative cellule spleniche secernenti IgG si è rivelata indipendente dall'assenza del GALT, mentre solo i topi privi di placche di Peyer hanno dimostrato scarsissimi titoli fecali di IgA specifiche per l'antigene e una marcata paucità di cellule secernenti tali IgA. Gli animali dotati di placche di Peyer, anche in mancanza dei follicoli linfoidi isolati, hanno dato luogo a risposte IgA normali (489). In un altro studio, un gruppo di topi è stato assegnato alla somministrazione orale di un ceppo non invasivo di *Salmonella enterica* ssp. *typhimurium*, mentre ad un altro gruppo è stato somministrato un ceppo invasivo *wt* del batterio (490). Nei soli topi assegnati al ceppo invasivo si evidenziava tumefazione delle placche di Peyer; i linfonodi mesenterici e la milza erano invece tumefatti in tutti gli animali. L'esame immunoistochimico delle placche di Peyer permetteva di identificarvi il batterio invasivo nei topi con esso infettati; conversamente, il ceppo non invasivo non si riscontrava nelle placche di Peyer degli animali corrispondenti. Tuttavia, in tutti i topi si evidenziava la colonizzazione dei villi intestinali da parte dei batteri, e ciò suggerisce che, nonostante l'incapacità del batterio non invasivo di localizzarsi nelle placche di Peyer mediante attraversamento delle cellule M, esso sia comunque captato dalle cellule dendritiche. Per di più, l'insorgenza di una risposta infiammatoria nelle placche di Peyer, con l'aumento della secrezione di IL-1β e dell'espressione di MHC I sulle cellule dendritiche, si è verificata soltanto nell'infezione da *S. typhimurium* invasivo. Inoltre, l'infezione di topi con un altro ceppo invasivo ma non replicativo ha prodotto risposte IgA e IgG, mentre con un ceppo non invasivo né replicativo sono scaturiti esclusivamente anticorpi IgG. Parallelamente, soltanto nelle infezioni da ceppi invasivi si notava la generazione di cellule secernenti IgA *Salmonella*-specifiche nelle placche di Peyer (490). Nell'infezione da *Helicobacter pylori*, le placche di Peyer si sono rivelate indispensabili per lo sviluppo della gastrite (491). Invero, in un modello murino, l'infezione da *H. pylori* in topi privi di placche di Peyer non ha prodotto una gastrite, pur essendosi riscontrato, a due mesi dall'infezione, *H. pylori* in grande numero nella mucosa gastrica. Allo stesso tempo, nei topi Rag2$^{-/-}$, ossia incapaci di formare linfociti T, e privi inoltre delle placche di Peyer, il trasferimento di linfociti T CD4^{+} provenienti da topi *wt* infettati con *H. pylori* induce una gastrite. Al contrario, il trasferimento di cellule T CD4^{+} vergini in questi animali non genera gastrite. Questi risultati evidenziano il ruolo delle placche di Peyer come sito induttivo delle risposte infiammatorie da cui dipende la gastrite da *H.* pylori, chiarendo al contempo che le placche di Peyer non sono indispensabili per l'espletamento delle funzioni effettrici in tal senso (491). In merito a quanto sopra illustrato, molti agenti patogeni con un tropismo per l'apparato digerente invadono le placche di Peyer passando attraverso le cellule M (451). Se da un lato le placche di Peyer, mediante le cellule M, campionano gli antigeni presenti nel lume intestinale per instaurare le risposte immunitarie mucosali, dall'altro, tali meccanismi di transcitosi forniscono agli agenti patogeni una corsia preferenziale per la colonizzazione dei tessuti linfoidi (451,492). Un esempio è costituito dall'*Escheritia coli* enteroemorragico (EHEC) e dall'*E. coli* enteropatogeno (EPEC) del sierotipo O55, i quali hanno dimostrato di aderire all'epitelio associato ai follicoli delle placche di Peyer umane in preparati istologici, con l'insorgenza di lesioni *attaching/effacing* in tali siti (493,494). *Yersinia enterocolitica* aderisce all'epitelio associato ai follicoli e viene trasportata

nella regione sottoepiteliale a cupola delle placche di Peyer (495,496); pur non distruggendo l'epitelio associato ai follicoli, il batterio prolifera nelle placche di Peyer, migrando nei centri germinativi e nella circostante lamina propria, con la successiva distruzione dell'architettura delle placche di Peyer (496). Il ceppo invasivo murino SL1344 della precedentemente menzionata *S. typhimurium* aderisce alle cellule M e le travalica per accedere ai tessuti sottostanti (497,498). Al contrario della *Y. enterocolitica*, tuttavia, *S. typhimurium* SL1344 causa profonde alterazioni morfologiche delle cellule M, con evidenti increspature della membrana apicale, rigonfiamento mitocondriale, ridistribuzione dei microfilamenti di actina e raggrinzimento della cellula, con successiva morte cellulare (497,498). Dopo la necrosi delle cellule M, *S. typhimurium* SL1344 provoca il distacco dei circostanti enterociti dell'epitelio associato ai follicoli (498). Congiuntamente, si osservano anche attivazione di linfociti delle sottostanti placche di Peyer e materiale necrotico nella regione sottoepiteliale a cupola (498). Oltre ai batteri, anche molti virus sono soggetti a transcitosi da parte delle cellule M. Uno di questi è l'HIV-1, di cui è ben nota la capacità di aderire alle cellule M e di venire quindi internalizzato e trasportato all'interno delle stesse (492). Il passaggio transepiteliale di HIV-1 è recettore dipendente (499). In particolare, il ceppo linfotropico di HIV-1 X4, in grado di attraversare il monostrato di cellule M e di infettare i sottostanti linfociti T $CD4^+$, richiede sia il recettore CXCR4 sia il lattosil cerebroside, entrambi espressi sulle cellule M, per svolgere tali funzioni (499). Diversamente, il ceppo monotropico R5 non riesce a passare naturalmente attraverso le cellule M. Tuttavia, la trasfezione di cellule Caco-2 con il recettore CCR5 permette a M5 di infettarle (499). Nell'apparato digerente umano, il lattosil cerebroside è presente sull'orletto a spazzola delle cellule M e degli enterociti dell'epitelio associato ai follicoli, e CCR5 è espresso sugli enterociti dell'epitelio associato ai follicoli, ma non su quelli dei villi (499). CCR5 e CXCR4 sono entrambi espressi sugli enterociti delle cripte dell'intestino tenue e, nel colon, sia nelle cripte sia nella superficie del lume (499,500). Compiuto l'attraversamento delle mucose dell'apparato digerente, l'HIV-1 può entrare in contatto con le sue principali cellule bersaglio, ossia i linfociti T $CD4^+$, i quali vanno incontro ad una rapida deplezione sia nel MALT sia a livello sistemico (501). Ospitando la maggior parte dei linfociti dell'organismo, il GALT rappresenta un importante sito di replicazione di HIV-1 (501). Nello specifico, è emerso che la deplezione di linfociti T $CD4^+$ è notevolmente più significativa nella mucosa duodenale rispetto al sangue periferico nel corso dell'infezione da HIV, particolarmente nelle fasi iniziali (502). Ad aggravare ulteriormente tale situazione, il GALT contiene anche altre cellule della linea differenziativa linfoide e di quella monocitaria che il virus può adoperare come bersagli (501). Occorre puntualizzare che i macrofagi intestinali esprimono ridotti livelli di CD4, il quale costituisce il recettore di HIV-1, e dei co-recettori del virus CCR5 e CXCR4 (503,504). Tali fagociti risultano pertanto poco permissivi alla replicazione di HIV-1, potendo questi essere infettati dal virus soltanto a dosi molto elevate (503,504). Tuttavia, analisi immunoistochimiche hanno rivelato popolazioni di cellule dendritiche e di macrofagi, rispettivamente nelle mucose e nella lamina propria umane del colon sigmoideo e del retto le quali, date le caratteristiche fenotipiche, ci si attende siano suscettibili all'infezione da HIV-1 (505). Inoltre, gli Autori dello studio hanno ipotizzato che la presenza di tali popolazioni cellulari nei tratti distali dell'intestino crasso possa spiegare la maggiore efficienza della trasmissione rettale dell'HIV-1 (505). In seguito, è stato confermato che alcune cellule dendritiche colorettali vengono effettivamente infettate da HIV-1 e lo trasmettono ai linfociti T $CD4^+$ (506). Studi clinici supportano l'ipotesi che il GALT sia un sito di persistenza dell'HIV-1 in corso di terapia antiretrovirale di combinazione (cART) (507–509). Addizionalmente, la terapia cART, pur consentendo il ripristino dei linfociti T $CD4^+$ del sangue, determina un recupero più ritardato e solo incompleto delle cellule T $CD4^+$ del GALT, prevalentemente nelle cripte e alla base dei villi intestinali, con un contestuale incremento

delle risposte T $CD8^+$ HIV-specifiche nel GALT (510,511). Gli effetti nefasti dell'HIV-1 sull'apparato digerente si estendono ben oltre il GALT, con lo sviluppo di un'enteropatia caratterizzata da una disfunzione della barriera intestinale (512,513). Tale alterazione potrebbe compromettere l'assorbimento dei nutrienti e la terapia antiretrovirale (512). All'esame istologico, la mucosa dell'intestino tenue manifesta atrofia dei villi con appiattimento e ampliamento delle figure villose, e iperplasia delle cripte, purtuttavia senza apprezzabili anomalie numeriche dei linfociti intraepiteliali (514–516). Esami istologici sulle mucose del digiuno di macachi affetti da un'infezione da SIV hanno rivelato dilatazione dei vasi chiliferi, infiltrati linfocitari e materiale necrotico all'apice dei villi (517).

Aspetti anatomici e istologici dell'immunizzazione per via orale

Tra i vaccini per via orale, i vivi attenuati si rivelano più efficaci rispetto ai vaccini inattivati (518). Malgrado ciò, i vaccini vivi attenuati manifestano l'eventualità di un recupero della virulenza, con il rischio di malattie indotte da vaccini (518). Con la somministrazione orale di un vaccino, parte dell'antigene viene degradato nello stomaco e nell'intestino (519). Dal punto di vista anatomico e funzionale, i meccanismi di induzione delle risposte immunitarie della vaccinazione orale differiscono notevolmente da quelli delle vaccinazioni parenterali. Con il vaccino orale, infatti, ad essere esposte all'antigene sono le mucose dell'apparato digerente, e il sito induttivo risiede quindi nel GALT. Gli antigeni vaccinali che raggiungono il lume intestinale possono interagire con le cellule M e andare incontro a transcitosi. Nella regione sottoepiteliale a cupola, gli antigeni sono captati e internalizzati dalle cellule dendritiche, che li presentano ai linfociti T $CD4^+$ vergini nelle zone parafollicolari. In maniera prettamente sovrapponibile ad una reazione immunitaria timo-dipendente che accade in un linfonodo, al confine tra le aree T e i follicoli avviene il contatto tra le cellule B e i linfociti T che hanno riconosciuto lo stesso antigene. In un'area più profonda del follicolo, queste cellule B e T danno luogo a una reazione del centro germinativo con scambio isotipico verso le IgA e maturazione dell'affinità anticorpale. I vaccini per uso orale, al pari di quelli intranasali, generano robuste risposte umorali IgA e IgG (519–522). Uno studio di immunizzazione orale in un modello murino ha permesso di caratterizzare le risposte cellulari B intestinali come oligoclonali (523). Tali reazioni sono risultate il frutto di un processo sincronizzato di selezione delle cellule mediante maturazione dell'affinità, il quale richiede ripetute somministrazioni antigeniche. Linfociti B appartenenti allo stesso clone sono stati riscontrati in diverse placche di Peyer. Ciò suggerisce che le cellule B possano migrare tra le placche di Peyer dopo l'iniziale attivazione, innestandosi in un centro germinativo diverso da quello di origine ove proseguire la proliferazione. Le plasmacellule secernenti IgA specifiche per l'antigene sono apparse ampiamente distribuite nella lamina propria dell'intestino tenue e del crasso, senza aggregazioni. Tale riscontro suggerisce una dispersione a distanza delle plasmacellule originate in un sito anziché una proliferazione locale accanto ad un follicolo linfoide isolato (523). Con la ricircolazione, i linfociti B della memoria e le plasmacellule a lunga emivita abbandonano il GALT tramite i vasi chiliferi e giungono ai linfonodi mesenterici (519). Riversatesi nel dotto toracico e quindi nel circolo sistemico, tali cellule si localizzano nel midollo osseo e nei siti effettori dell'intestino tenue e del crasso (519).

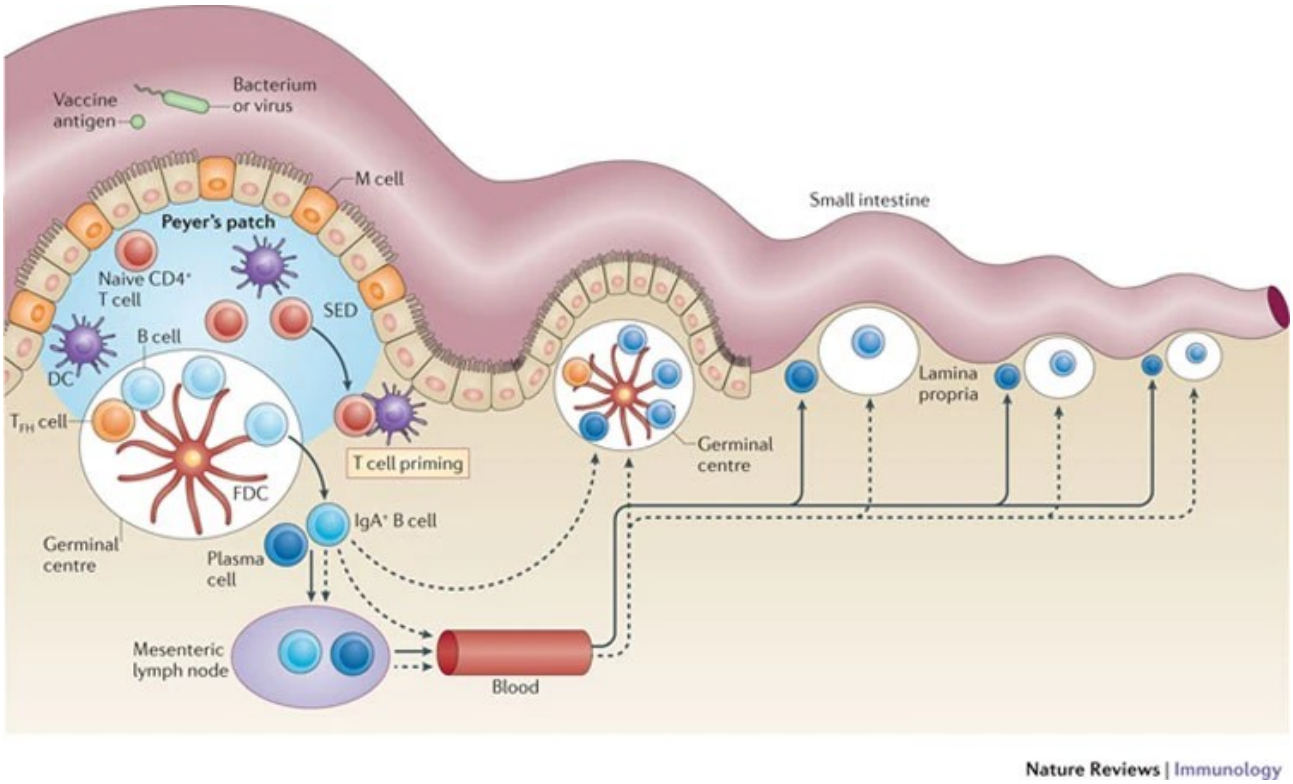

Figura 42. Risposte immunitarie nelle placche di Peyer (519)**.** Illustrazione delle reazioni immunitarie ad un antigene vaccinale o a un microrganismo, in cui si rappresentano le funzioni di captazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche, presentazione dell'antigene ai linfociti T, reazione del centro germinativo, trasferimento delle cellule B ad un altro sito induttivo e ricircolazione dei linfociti B e delle plasmacellule ai linfonodi mesenterici, al circolo sistemico, e infine ai siti effettori intestinali.

Tessuto linfoide associato alla mucosa gastrica

La mucosa gastrica normale è priva di tessuti linfoidi organizzati (524). La colonizzazione microbica dello stomaco è ostacolata dall'acidità del succo gastrico e dallo spesso strato di muco che riveste la mucosa gastrica. Tali condizioni inibiscono fisiologicamente l'accumulo di aggregati linfoidi in quest'organo. Lo stomaco è però sede di sviluppo di linfomi. Affinché un linfoma possa originarsi nello stomaco, è essenziale che si generi un tessuto linfoide organizzato con caratteristiche proprie del MALT nel tessuto gastrico. L'infezione da *Helicobacter pylori* porta all'acquisizione di tessuti linfoidi associati alla mucosa gastrica contenenti follicoli di cellule B e ricoperti un epitelio a cupola contenente linfociti (524). Il ruolo dell'*H. pylori* nella patogenesi dei linfomi del MALT gastrico è ampiamente riconosciuto (524–526). Istologicamente, i linfomi del MALT gastrico sono caratterizzati da lesioni linfoepiteliali, con invasioni delle ghiandole gastriche da parte di cellule neoplastiche simili ai centrociti o di piccoli linfociti dai caratteri morfologici e cromatici anormali (526). I centri germinativi che normalmente si osservano in una gastrite da *H. pylori* possono ospitare cellule di linfoma, con la disgregazione della circostante zona mantellare. Gli aggregati linfoidi atipici determinano in generale un'espansione della sottomucosa e spesso anche l'infiltrazione e la perforazione della *muscularis mucosae*. Nelle forme più estese si riscontrano ulcere della mucosa e infiltrazioni della *muscularis propria* (526).

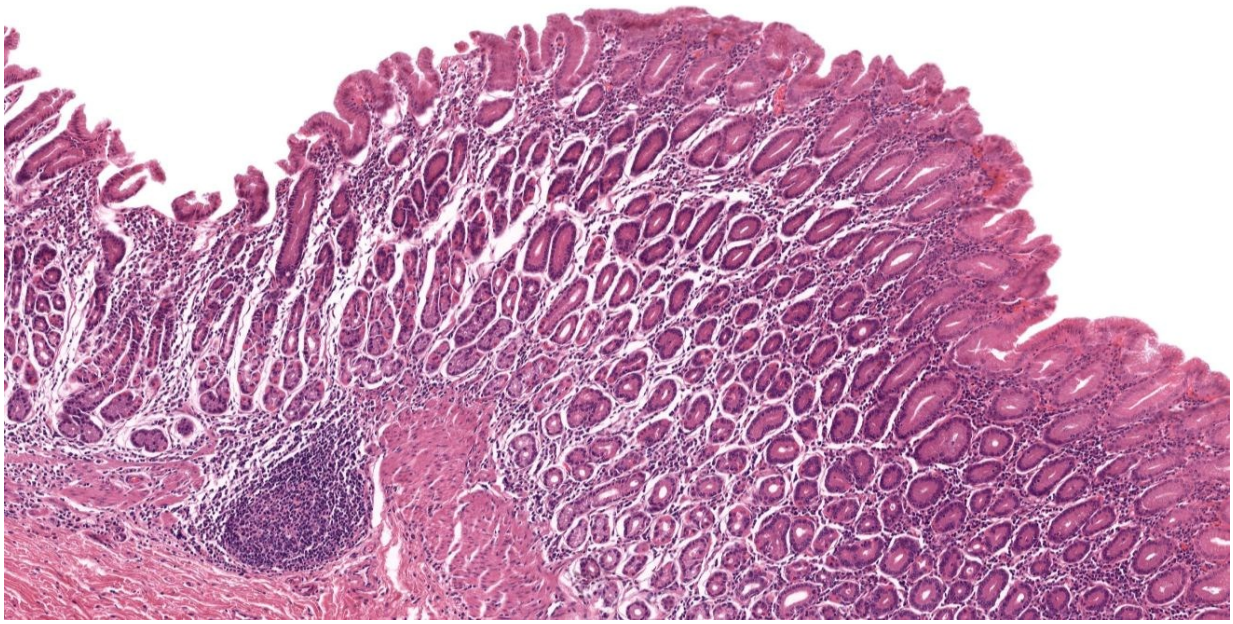

Figura 43. Tessuto linfoide associato alla mucosa gastrica (447)**.** Particolare di un preparato istologico di parete gastrica raffigurante la mucosa e parte della sottomucosa. Le ghiandole gastriche appaiono per la maggior parte in sezione trasversale, e negli spazi tra di esse sono visibili linfociti. In basso a sinistra, tra la mucosa e la sottomucosa, si nota un aggregato di linfociti.

Anello linfatico di Waldeyer

L'anello linfatico di Waldeyer è un insieme di tessuti linfoidi associati alle mucose del nasofaringe e dell'orofaringe, disposti rispettivamente in una configurazione circonferenziale (527). L'anello di Waldeyer è definito incompleto, in quanto i diversi tessuti che lo compongono non sono tra loro interconnessi. Data la sua collocazione anatomica, l'anello linfatico di Waldeyer esercita un ruolo primario nella scansione degli antigeni che transitano attraverso il canale orale e quello nasale prima di accedere all'apparato digerente e all'apparato respiratorio, e nell'induzione e nel mantenimento delle risposte immunitarie a tali antigeni. Dell'anello di Waldeyer fanno parte la tonsilla faringea, le tonsille tubariche, le tonsille palatine e le tonsille linguali (527). La tonsilla faringea, impari e mediana, si estende tra la volta e la parete posteriore del nasofaringe; il suo drenaggio linfatico è diretto ai linfonodi retrofaringei e faringomascellari. Ciascuna delle due tonsille tubariche è posizionata posteriormente all'orifizio della tuba uditiva, in associazione con il *torus tubarius*. Ognuna delle due tonsille palatine risiede in una delle fosse tonsillari, ciascuna delimitata dai pilastri tonsillari anteriore e posteriore. I vasi linfatici efferenti delle tonsille palatine drenano ai linfonodi giugulodigastrici e retrofaringei. Infine, le tonsille linguali sono entrambe localizzate alla base della lingua, e presentano una contiguità con le tonsille palatine al solco glossotonsillare. La superficie mediale delle tonsille palatine presenta alcune profonde invaginazioni, le cripte tonsillari, morfologicamente analoghe a diverticoli tubolari. La superficie luminale di tali cripte è caratterizzata da un'alternanza tra un epitelio pavimentoso stratificato non cheratinizzato e un epitelio dall'aspetto reticolato ospitante linfociti intraepiteliali. Quest'ultimo, comprendente cellule M, è a diretto contatto con i sottostanti follicoli linfoidi, i quali si trovano immersi in una matrice di tessuto fibroso. La tonsilla faringea è principalmente costituita da epitelio colonnare pseudostratificato, e la sua superficie libera è ripiegata in pliche mucosali. Sia le cripte sia i follicoli linfoidi sono presenti nella tonsilla faringea in numero

minore rispetto alle tonsille palatine. Grazie alla convoluzione superficiale fornita dalle cripte, le tonsille massimizzano l'area di interazione con gli antigeni e il numero di follicoli linfoidi che con essi possono venire a contatto (527). Le cellule M, come in altri organi, internalizzano gli antigeni luminali e li rilasciano nella regione sottoepiteliale, ove le cellule dendritiche e i macrofagi possono captarli, processarli e presentarli ai linfociti T $CD4^+$ delle aree parafollicolari (527,528).

SCOPO DELLA TESI

Con il presente studio si è inteso investigare l'attività adiuvante di tre ceppi probiotici, ovvero *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri* L6 e *Lactobacillus gasseri* CO-L04, sulle risposte immunitarie indotte da un vaccino antinfluenzale somministrato per via intramuscolare. Lo studio è stato condotto in modello murino. Gli effetti adiuvanti di ognuno dei tre ceppi di lattobacilli sono stati confrontati tra loro, e sono inoltre stati rapportati con il trattamento di immunizzazione senza uso di probiotici. Mediante tecniche ELISA sono state valutate le risposte anticorpali virus-specifiche nel siero e nel tessuto polmonare degli animali trattati. La valutazione delle risposte cellulari sistemiche è stata condotta su linfociti splenici mediante analisi citofluorimetrica.

MATERIALI E METODI

MATERIALI

Animali

Ventiquattro topi BALB/c maschi di 6-8 settimane di vita sono stati stabulati presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Padova, Istituto di Fisiologia, ed impiegati nel presente studio. Tutte le procedure a cui sono stati sottoposti gli animali sono state svolte nel rispetto delle normative vigenti in ambito etico, sia italiane che europee, con particolare riferimento alla Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio e del Decreto Legislativo n. 26 del 2014.

Anticorpi

Nei protocolli ELISA sono stati utilizzati gli anticorpi secondari Rat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 04-6020), Rat anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody, HRP, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 18-4015-82), Rat anti-Mouse IgG2a Secondary Antibody, HRP, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo SA1-35646), e Rat Anti-Mouse IgA-HRP (11-44-2) (SouthernBiotech, Birmingham, AL, Stati Uniti, n. catalogo 1165-05), derivanti dal ratto, rispettivamente per l'analisi dei titoli di IgG totali, IgG1, IgG2a e IgA murine. Nell'analisi citofluorimetrica è stato fatto impiego degli anticorpi CD45 Monoclonal Antibody (30-F11), eFluor 506, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 69-0451-82), CD4 Monoclonal Antibody (GK1.5), FITC, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 11-0041-82), CD8a Monoclonal Antibody (53-6.7), APC, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 17-0081-82), IFN gamma Monoclonal Antibody (XMG1.2), PE, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 12-7311-82), CD19 Monoclonal Antibody (eBio1D3 (1D3)), PE, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 12-0193-82), e CD24 Monoclonal Antibody (M1/69), eFluor 450, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 48-0242-82), derivanti dal ratto, rispettivamente per la marcatura delle molecole CD45, CD4, CD8, IFN-γ, CD19 e CD24, e l'anticorpo CD27 Monoclonal Antibody (LG.7F9), PE-Cyanine7, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia, n. catalogo 25-0271-82), derivante dal criceto nano grigio, per la marcatura del recettore CD27.

Vaccino

Agli animali è stato somministrato un vaccino antinfluenzale inattivato trivalente per l'iniezione intramuscolare, acquistato presso una farmacia padovana. Il vaccino risultava relativo ai ceppi influenzali A/Victoria/4897/2022(H1N1)pdm09-simile, A/Thailand/8/2022(H3N2)-simile, e B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria *lineage*)-simile, circolanti nella stagione invernale 2024-2025.

Probiotici

I probiotici sperimentati in questo studio ci sono stati forniti dalla ditta Coree S.r.l. Coreegroup, PIacenza, Italia. Nessuna informazione aggiuntiva è stata addotta dall'azienda in merito all'origine e alla preparazione dei ceppi.

Proteine virali

Nei saggi ELISA e nel *challenge in vitro* degli splenociti sono state impiegate le proteine virali ricombinanti Influenza A H1N1 (A/Victoria/4897/2022) Hemagglutinin / HA Protein (ECD, His Tag) (Sino Biological, Inc., Beijing, Cina, n^ catalogo 40938-V08B) e Influenza A [A/Victoria/4897/2022(H1N1)] Neuraminidase (NA) Protein, His Tag (SPR verified) (Acro Biotech, Inc., Rancho Cucamonga, CA, Stati Uniti, n^ catalogo NEE-V524c). Tali antigeni corrispondevano a quelli del virus A/Victoria/4897/2022(H1N1)pdm09-simile.

PBS (*Phosphate-Buffered Saline*)

Il PBS impiegato nel presente studio è stato formulato disciogliendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM e KH_2PO_4 1,8 mM in acqua distillata. Tali sostanze sono state acquistate dalla Merck KGaA, Darmstadt, Germania.

Apparecchiature

Le operazioni di centrifugazione sono state condotte con una centrifuga refrigerata Eppendorf 5702 R G (Eppendorf SE, Amburgo, Germania). Per le analisi ELISA sono state impiegate piastre a 96 pozzetti apposite per ELISA (GeneDireX, Inc., Zhunan Township, Taiwan, n. catalogo PC301-0200). I campioni di tessuto polmonare sono stati pesati con una bilancia Kern PDT 300-3 a 0,001 g (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germania). Altri apparecchi impiegati per applicazioni più sporadiche o specifiche saranno illustrati per esteso nelle Sezioni che seguono.

DISEGNO SPERIMENTALE

Primo trattamento con probiotici: dal giorno -6 al giorno -1

I topi sono stati suddivisi in sei gruppi di trattamento e due gruppi di controllo, con quattro animali per ogni gruppo. Tre dei gruppi di trattamento sono stati assegnati alla somministrazione dei probiotici per via intranasale, in modo tale che, per ogni gruppo, gli animali ad esso appartenenti ricevessero una dose giornaliera di 10^6 CFU di un diverso probiotico (*L. plantarum*, *L. gasseri* L6 o *L. gasseri* CO-L04) in 10 µl di sospensione intranasale. Ai restanti tre gruppi, i probiotici sono stati somministrati mediante *gavage* intragastrico. Per ciascuno di questi ultimi, gli animali hanno ricevuto una dose giornaliera di 10^9 CFU di un diverso probiotico (*L. plantarum*, *L. gasseri* L6 o *L. gasseri* CO-L04) in 100 µl di

sospensione intragastrica. Gli animali appartenenti ai due gruppi di controllo hanno ricevuto, in luogo delle sospensioni di probiotici, solo PBS sterile. La somministrazione di probiotici, mediante la via intranasale o intragastrica a seconda dei gruppi, è stata attuata per 6 giorni consecutivi, una volta al giorno.

Immunizzazione: giorno 0

Il giorno successivo rispetto all'ultimo giorno di tale iniziale trattamento probiotico si è proceduto all'immunizzazione dei topi con il vaccino antinfluenzale. La preparazione vaccinale è stata somministrata agli animali mediante iniezione intramuscolare in un'unica dose di 2,1 µg di HA totale per topo. La vaccinazione è stata fornita a tutti gli animali trattati con i probiotici e ad uno dei gruppi di controllo, mentre l'altro gruppo di controllo non ha subìto l'immunizzazione.

Ulteriore trattamento con probiotici: dal giorno +1 al giorno +6

A partire dal giorno successivo all'inoculo vaccinale, il trattamento con i probiotici è ripreso, e per ogni gruppo è stato utilizzato lo stesso probiotico impiegato nella fase sperimentale antecedente all'immunizzazione. I ceppi batterici sono stati peraltro somministrati alle medesime condizioni di dosaggio giornaliero e di via di somministrazione precedentemente adottate per ciascun gruppo. Anche questo trattamento è stato svolto per 6 giorni consecutivi. Parallelamente, i due gruppi di controllo hanno ricevuto nuovamente solo PBS sterile.

Sacrificio degli animali e prelievo di organi e tessuti: giorno +21

Dopo 15 giorni dall'ultima somministrazione di probiotici, i topi di tutti gli 8 gruppi di studio sono stati sacrificati. Ottenuta l'anestesia generale, il sangue è stato estratto dagli animali mediante un prelievo cardiaco. Alla dissezione, per ogni topo sono stati prelevati campioni di tessuto polmonare e la milza. Gli organi e i tessuti sono stati trasportati in ghiaccio al Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università degli Studi di Padova, Sezione di Microbiologia, per l'espletamento delle necessarie procedure tecniche e analitiche.

TECNICHE DI ANALISI

Sono stati adottati protocolli ELISA ai fini della quantificazione delle IgG totali, delle IgG1 e delle IgG2a virus-specifiche nel siero e delle IgA virus-specifiche nel tessuto polmonare. Occorre tuttavia precisare che, avendo ricercato nei saggi ELISA gli anticorpi specifici per le proteine HA e NA del solo ceppo virale A/Victoria/4897/2022(H1N1)pdm09-simile, le risposte anticorpali che verranno presentate saranno esclusivamente quelle relative a tale virus. La milza è stata analizzata ai fini della quantificazione, mediante citofluorimetria a flusso, dei linfociti T attivati in senso Th1, dei linfociti B attivati, e dei linfociti B della memoria. Nello specifico, per valutare il contributo di ciascun probiotico e dell'immunizzazione senza uso di probiotici sull'aumento delle percentuali di linfociti, le sospensioni cellulari ottenute dalla milza

di ogni animale sono state suddivise in due aliquote. Per ciascun topo, una di tali aliquote è stata sottoposta alla restimolazione *ex vivo* con gli antigeni virali (*challenge in vitro*), mentre l'altra non è stata restimolata. Il *challenge in vitro* è stato attuato ai fini della valutazione dell'impatto che la vaccinazione e i probiotici hanno esercitato sull'attivazione delle risposte immunitarie secondarie; pertanto, essendosi effettuato il *challenge* con i soli antigeni del ceppo A/Victoria/4897/2022(H1N1)pdm09-simile, l'analisi delle risposte secondarie ha interessato solo tale virus, escludendo gli altri due ceppi del vaccino. Nella tecnica citofluorimetrica, l'antigene CD45 è stato impiegato come marcatore dei leucociti in genere, l'IFN-γ e i co-recettori CD4 e CD8 sono stati assunti collettivamente come marcatori per il riconoscimento dei linfociti T attivati in senso Th1, i co-recettori CD19 e CD24 sono stati congiuntamente adoperati per l'identificazione dei linfociti B attivati e, infine, la ricerca delle cellule B della memoria è stata attuata mediante la combinazione dei co-recettori CD19 e CD27.

OPERAZIONI TECNICHE E ANALITICHE

Ottenimento del siero

Il sangue prelevato a ciascun animale è stato inserito, immediatamente dopo la raccolta, in un tubo da centrifuga da 1,5 ml provvisto di tappo a scatto e privo di anticoagulanti. I tubi in tal modo ottenuti, opportunamente numerati per consentirne l'identificazione dell'animale di provenienza, sono stati dunque mantenuti alla temperatura ambientale per 60 minuti per consentire la coagulazione del sangue. A coagulazione avvenuta, i tubi sono stati inseriti in una centrifuga e centrifugati a 1300 rpm (giri/minuto) per 15 minuti a 4°C per separare la componente cellulare del sangue dal siero. Al termine della centrifugazione, il surnatante, ossia il siero, presente in ogni tubo è stato prelevato con una micropipetta analogica e trasferito in un altro tubo da centrifuga portante il numero corrispondente allo stesso topo. Nella necessità di effettuare tre separate quantificazioni anticorpali sullo stesso campione di siero ottenuto da ciascun animale, ogni campione è stato suddiviso in tre aliquote, ciascuna da impiegare in un'analisi diversa e conservata in un tubo adeguatamente etichettato. Tutti i tubi numerati contenenti il siero sono stati posti in congelatore a -80°C per un'appropriata conservazione in attesa delle successive operazioni analitiche.

ELISA per la quantificazione di anticorpi IgG totali, IgG1 e IgG2a virus-specifici nel siero

Sono state istituite tre separate procedure ELISA, ovvero una per ciascuna delle tre determinazioni quantitative anticorpali, rispettivamente in relazione alle IgG totali, alle IgG1 e alle IgG2a virus-specifiche. Per ognuna delle suddette analisi, le superfici interne dei pozzetti di una piastra sono state ricoperte ("*coating*") con le proteine HA e NA del virus influenzale A(H1N1); per ottenere ciò, in ciascun pozzetto sono stati inseriti 100 µl di una soluzione contenente le proteine HA e NA di A(H1N1), ciascuna alla concentrazione di 0,001 µg/µl, disciolte in PBS. La piastra è stata allora sigillata con un foglio in materiale plastico e incubata *overnight* alla temperatura ambientale per consentire l'adesione delle proteine alla superficie dei pozzetti. Il giorno seguente si è provveduto alla rimozione del foglio apposto per sigillare i

pozzetti, e l'intera piastra è stata sottoposta a tre consecutivi lavaggi con PBST, costituito da PBS con l'aggiunta di Tween 20 (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) alla concentrazione di 0,1%, al fine di rimuovere gli antigeni non aderiti ai pozzetti. Tra un lavaggio e il successivo e al termine dell'ultimo lavaggio, la piastra è stata ripetutamente percossa su uno strato di fogli di carta assorbente, con l'apertura dei pozzetti rivolta verso i fogli. A tal punto, si è proceduto al blocco della superficie dei pozzetti non legata agli antigeni allo scopo di impedire successive interazioni aspecifiche degli anticorpi sierici con la superficie plastica, riducendo, in ultima analisi, rumori di fondo. La saturazione di tali siti è stata conseguita mediante trasferimento in ciascun pozzetto di una soluzione di albumina di siero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Dopo un'incubazione di un'ora a temperatura ambientale, la piastra è stata lavata per tre volte con le modalità precedentemente illustrate. Per ogni campione di siero proveniente da ciascun animale sono state dunque preparate diverse diluizioni con PBST. Ogni singola diluizione derivante dal siero degli animali è stata collocata in un diverso pozzetto. Due pozzetti sono stati impiegati come bianco, per cui in essi è stato inserito PBST anziché una diluizione del siero. Seguiva un'incubazione di due ore a temperatura ambientale, in modo tale da consentire il legame tra gli anticorpi sierici e gli antigeni virali aderiti ai pozzetti. A seguire, sono stati effettuati 5 lavaggi della piastra, mediante le medesime modalità di cui sopra, al fine di rimuovere gli anticorpi sierici non legati all'antigene. Si procedeva infine all'aggiunta ad ogni pozzetto dell'anticorpo secondario specifico per anticorpi murini IgG, IgG1 o IgG2a, a seconda dell'analisi considerata, coniugati all'HRP. Al termine di un ulteriore periodo di incubazione di un'ora alla temperatura ambientale, atteso per autorizzare il legame dell'anticorpo secondario alle IgG sieriche, la piastra è stata nuovamente sottoposta ad un lavaggio per 5 volte. Ad ogni pozzetto è stata dunque aggiunta una soluzione di TMB (Merck KGaA, Darmstadt, Germania), substrato dell'HRP, e la piastra è stata incubata per 15 minuti al buio mediante ricopertura con un foglio di alluminio. Alla rimozione del foglio, la reazione enzimatica è stata arrestata con una soluzione di acido solforico per stabilizzare il segnale in vista della misurazione. Inserendo la piastra nel lettore Varioskan Reader (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), la densità ottica di ciascun pozzetto è stata rivelata scansionando la piastra alla lunghezza d'onda di 450 nm.

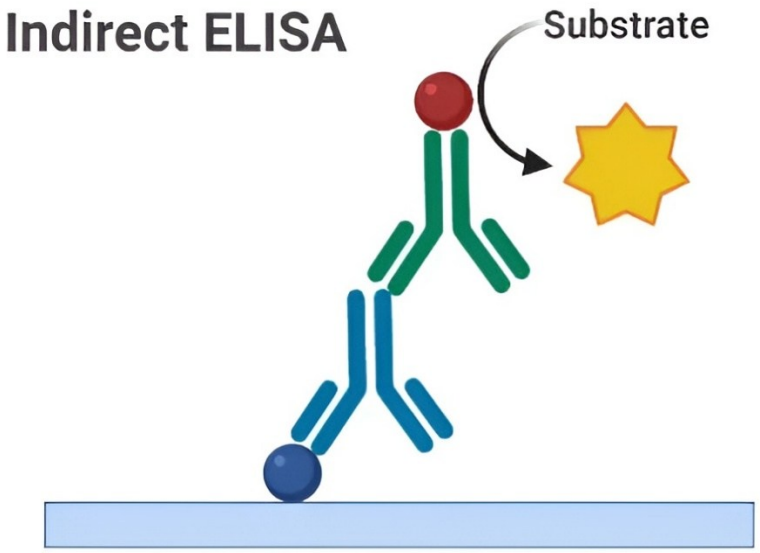

Figura 44. Protocollo di ELISA indiretto utilizzato nel presente studio (529)**.** La sfera blu rappresenta una delle proteine viralei adsorbite sulla superficie del pozzetto, mentre l'anticorpo blu raffigura gli anticorpi del siero e del tessuto polmonare specifici per la proteina. L'anticorpo verde connesso alla sfera rossa costituisce invece l'anticorpo secondario legato all'HRP.

Isolamento delle cellule mononucleate della milza

Ciascuna milza dei topi sacrificati è stata inserita in un tubo da centrifuga numerato, ove era immersa nel mezzo di coltura RPMI-1640 completo (Merck KGaA, Darmstadt, Germania), e i tubi sono stati trasportati in ghiaccio presso il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Padova, Sezione di Microbiologia. Ogni milza è stata estratta dal proprio tubo, ed è stata attuata una disgregazione del tessuto splenico con l'utilizzo di un setaccio cellulare da 70 µm in acciaio inox e di un rasoio chirurgico sterile. Il setaccio è stato lavato con una modesta, ma costante, quantità di PBS all'esito di ogni operazione per garantire il più accurato recupero di cellule. La sospensione cellulare derivante da ciascuna milza è stata singolarmente raccolta in un altro tubo da centrifuga recante il numero dell'animale corrispondente. Le sospensioni cellulari sono state dunque centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti a 4°C. Il surnatante è stato accuratamente eliminato dai tubi e il *pellet* cellulare è stato dunque risospeso con nuovo PBS. A tal punto, si è proceduto al protocollo di separazione secondo gradiente delle cellule mononucleate: in altri tubi da centrifuga appositamente numerati è stato inserito un volume di Ficoll-Paque (Cytiva, Uppala, Svezia), e ciascuna sospensione cellulare è stata apposta al di sopra di questo nel tubo dal numero corrispondente. I tubi sono stati quindi centrifugati a 1200 rpm per 20 minuti a 4°C, senza freno motore. Al termine della centrifugazione, l'anello di cellule mononucleate in tal modo ottenuto in ciascun tubo è stato raccolto con una micropipetta e trasferito in un nuovo tubo con lo stesso numero, a cui è stato aggiunto un quantitativo costante di mezzo di coltura RPMI-1640 completo. Le cellule mononucleate sono state lavate dai residui di Ficoll-Paque mediante centrifugazione a 1600 rpm per 5 minuti. Dopo l'eliminazione del surnatante e la risospensione in nuovo RPMI-1640 completo, la centrifugazione delle cellule è stata ripetuta con lo stesso regime. Dopo l'ultimo lavaggio e l'ulteriore risospensione in RPMI-1640

completo, le sospensioni cellulari sono state suddivise in due aliquote di 1 ml di volume, ciascuna contenuta in un tubo. Per ogni sospensione di partenza, un'aliquota è stata sottoposta a *challenge in vitro*, con l'aggiunta di 1 ml di una soluzione contenente le proteine HA e NA del virus influenzale A(H1N1), ciascuna alla concentrazione di 10 µg/ml, disciolte in RPMI-1640 completo, mentre all'altra aliquota, non restimolata, è stato addizionato 1 ml di RPMI-1640 completo. L'aggiunta di queste soluzioni è stata attuata con l'obiettivo di raggiungere una concentrazione di 5 µg/ml di HA e di NA per le aliquote sottoposte a *challenge in vitro*, avendo precedentemente ottenuto aliquote di 1 ml ciascuna. Le sospensioni sono state dunque incubate per 6 ore alla temperatura di 37°C in un incubatore CellXpert C170i (Eppendorf SE, Amburgo, Germania) al 5% di CO_2 e ad alta umidità. Dopo 2 ore dall'inizio dell'incubazione, ad ogni aliquota sono stati aggiunti 2 µl di una soluzione alla concentrazione di 5 mg/ml di monensin (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Il monensin è in questo caso utilizzato come inibitore del trasporto proteico intracellulare: inibendo il trasporto delle citochine attraverso l'apparato di Golgi, il monensin consente di concentrare nelle cellule i prodotti del metabolismo e, nel nostro caso specifico, rende identificabile alla citofluorimetria la presenza intracellulare dell'IFN-γ, il quale verrebbe altrimenti secreto. Una volta rimosse dall'incubatore, tutte le sospensioni, restimolate e non, sono state centrifugate a 1600 rpm per 5 minuti a 4°C. Le cellule sono state risospese in una soluzione di fissazione preparata con il 2% di paraformaldeide (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) in PBS. La fissazione si è resa necessaria per conservare la morfologia e gli antigeni delle cellule, oltre che per la soppressione dell'attività metabolica e dell'internalizzazione degli antigeni, in previsione della refrigerazione. Al termine di un'incubazione di 20 minuti al buio in refrigeratore a 4°C, le cellule sono state nuovamente centrifugate a 1600 rpm per 5 minuti a 4°C, poi risospese in una soluzione di PBS con l'addizione di BSA allo 0,1%, e nuovamente centrifugate allo stesso modo per eliminare la paraformaldeide. Una volta ultimata tale operazione, le cellule sono state risospese in 1 ml di una soluzione di PBS con 0,1% di BSA e 0,1% NaN_3 (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Per ogni sospensione cellulare ottenuta, 100 µl sono stati allora trasferiti nei pozzetti di una piastra in polistirene a 96 pozzetti apposita per colture cellulari (GeneDireX, Inc., Zhunan Township, Taiwan, n. catalogo PC396-0100). A ciascun pozzetto sono stati quindi aggiunti 150 µl del *buffer* di PBS con 0,1% di BSA e 0,1% NaN_3. Una volta richiuso il coperchio, le cellule sono state osservate al microscopio ottico per accertare il buon esito del protocollo finora descritto. La piastra è stata infine posta in refrigeratore a 4°C.

Marcatura delle cellule mononucleate della milza

Il giorno successivo, tutte le sospensioni cellulari sono state centrifugate a 1600 rpm per 5 minuti a 4°C, e il *buffer* di conservazione è stato in tal modo eliminato. Le cellule sono state dunque risospese in 500 µl di un *buffer* di PBS allo 0,1% di BSA. Alle sospensioni è stato quindi aggiunto il reagente Fc Block (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) allo scopo di impedire il successivo legame aspecifico degli anticorpi di marcatura alle cellule mononucleate spleniche. I tubi sono stati dunque incubati per 15 minuti in ghiaccio al buio. Alla fine di tale periodo, alle sospensioni cellulari sono stati aggiunti gli anticorpi per la marcatura degli antigeni di membrana. In particolare, si addizionavano gli anticorpi anti-CD45 per la marcatura dei leucociti in generale, anti-CD4 e anti-CD8 per la marcatura dei linfociti T, anti-CD19 per la marcatura dei linfociti B, anti-CD24 per la marcatura dei linfociti B attivati, e anti-CD27 per la marcatura delle cellule B della memoria. Tale *cocktail* di anticorpi, del quale sono stati aggiunti 100 µl ad ogni sospensione cellulare, conteneva tutti gli anticorpi sopra

citati alla concentrazione di 1,5 µg/ml per ogni anticorpo. Il *buffer* di PBS allo 0,1% di BSA è stato adoperato per diluire gli anticorpi a dette concentrazioni. I tubi sono stati incubati per 45 minuti. Seguiva la centrifugazione a 300 rpm per 5 minuti a 4°C e l'eliminazione del surnatante per rimuovere gli anticorpi non legati alle cellule. Le cellule sono state a tal punto risospese con un *buffer* di permeabilizzazione a base di PBS con lo 0,1% di BSA e lo 0,1% di Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). L'impiego del Triton X-100 è volto a permeabilizzare la membrana cellulare allo scopo di consentirvi l'ingresso dell'anticorpo per la marcatura intracellulare dell'IFN-γ. Gli splenociti sono stati allora incubati per 30 minuti con l'anticorpo anti-IFN-γ per la marcatura dei linfociti T attivati in senso Th1. 100 µl di una diluizione di tale anticorpo alla concentrazione di 1,5 µg/ml, realizzata con lo stesso *buffer* già impiegato per il precedente *cocktail*, è stato infatti aggiunto ad ogni sospensione. Dopo ulteriore centrifugazione e rimozione del surnatante, le cellule spleniche sono state risospese in PBS con lo 0,1% di BSA. In attesa delle successive operazioni analitiche, i tubi sono stati conservati in ghiaccio in una scatola, schermati dal coperchio superiore.

Analisi citofluorimetrica delle cellule mononucleate della milza

Tutte le sospensioni di splenociti sono state analizzate con il citofluorimetro a flusso BD FACS Canto (BD Biosciences, San Jose, CA, Stati Uniti), e i dati sono stati processati e acquisiti grazie al programma BD FACSDiva Software.

Processazione del tessuto polmonare

Per ogni animale è stato prelevato un campione di tessuto polmonare corrispondente approssimativamente alla metà, in termini di massa, di un singolo polmone. Ciascun campione di tessuto è stato racchiuso in un tubo da centrifuga da 1,5 ml portante il numero corrispondente al topo di provenienza e conservato in ghiaccio nelle prime ore e poi a -80°C fino al giorno delle procedure tecniche. Nella necessità di omogeneizzare i campioni di tessuto polmonare è stato istituito un tampone RIPA (*RadioImmunoPrecipitation Assay buffer*) contenente Tris-HCl (tris(idrossimetil)amminometano cloridrato) (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) 10 mM e NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) 150 mM per la regolazione del pH e dell'isotonicità, l'1% di Triton X-100 e lo 0,1% di sodio deossicolato (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) come detergenti e EDTA (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) 3 mM quale inibitore di proteasi. Ogni campione tissutale è stato dunque pesato al fine di assegnarvi un idoneo volume di RIPA secondo il rapporto proporzionale di 5 µl di *buffer* per 1 mg di tessuto. Ultimati i calcoli, ciascun campione è stato trasferito, assieme all'appropriato volume di tampone RIPA, in un tubo per omogeneizzatore da 2 ml contenente sfere in ceramica, dotato di tappo avvitato (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA, n. catalogo HS10060). I tubi sono stati allora caricati in un omogeneizzatore a sfere Omni Bead Ruptor Elite (Revvity, Inc., Waltham, MA, USA), ed è stato esperito il processo di omogeneizzazione tissutale. A seguire, gli omogeneizzati sono stati incubati in ghiaccio per 15 minuti per facilitare l'estrazione delle proteine dal restante materiale cellulare da parte del *buffer* di lisi. Per facilitare il processo, durante tale tempo i tubi sono stati sottoposti a breve agitazione meccanica mediante un agitatore orbitale VORTEX 3 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germania). Terminata l'incubazione, gli omogeneizzati polmonari sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante, contenente le proteine, è stato separato dal

sottostante *pellet*, costituito da materiale cellulare insolubile, e trasferito in nuovi tubi. Il surnatante è stato infine spartito in tre aliquote di pari volume, ciascuna conservata a -80°C in un tubo numerato, avendo rinviato ad altro giorno le operazioni analitiche.

ELISA per la quantificazione di anticorpi IgA virus-specifici nel tessuto polmonare

La quantificazione delle IgA nel tessuto polmonare è stata attuata mediante un protocollo ELISA indiretto del tutto analogo a quelli illustrati per il siero. Data l'ampia sovrapponibilità procedurale tra la presente analisi e le precedenti, si percorrono ora solo gli stadi più rilevanti e distintivi del processo. Si è proceduto al *coating* dei pozzetti di una piastra in policarbonato a 96 pozzetti con le proteine HA e NA del virus influenzale A(H1N1). Dopo accurati lavaggi, la piastra è stata bloccata con una soluzione di BSA. Per ogni animale, al surnatante dell'omogeneizzato polmonare precedentemente preparato, sono state ricavate diverse diluizioni seriali con PBST, e ciascuna di esse è stata aggiunta ad un unico pozzetto. Anche in questo caso, due pozzetti sono stati adoperati come bianco. Le immunoglobuline di tale surnatante hanno quindi rivestito il ruolo di anticorpo primario, in quanto quelle specifiche per le proteine virali ancorate hanno potuto legarsi a queste ultime. Dopo ulteriori lavaggi, è stato addizionato l'anticorpo secondario, ossia l'anticorpo anti-IgA murine coniugato all'HRP. Seguivano allora il lavaggio, l'apporto dei TMB e l'arresto della reazione enzimatica. La piastra è stata dunque scansionata a 450 nm con lo stesso lettore precedentemente utilizzato, rivelando la densità ottica di ogni pozzetto.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte con il programma Prism 10.4.1 (GraphPad). I risultati sono riportati come media $\pm$ errore standard della media. La significatività statistica è stata calcolata mediante OneWay ANOVA e Bonferroni post hoc test. I dati sono stati ritenuti statisticamente significativi per $\mathbf{p < 0.05}$.

RISULTATI

ANALISI CITOFLUORIMETRICA DELLE CELLULE SPLENICHE

Nelle analisi relative alla citofluorimetria, l'immunizzazione ha aumentato le percentuali di tutte le cellule analizzate in maniera statisticamente significativa rispetto agli animali non trattati (**p < 0,001**). Tale significatività statistica viene annunciata ora in quanto non manifestamente riportata nei grafici che seguiranno.

Cellule T $CD4^+CD8^+IFN\gamma^+$ (linfociti T attivati in senso Th1)

La somministrazione del vaccino antinfluenzale ha incrementato la percentuale di cellule T $CD4^+CD8^+INF\text{-}\gamma^+$ rispetto agli animali non trattati (nt). Nel gruppo immunizzato con il vaccino senza trattamento con un probiotico e nei tre gruppi immunizzati e trattati con un probiotico per via intranasale, il *challenge in vitro* con gli antigeni virali ha significativamente ed ulteriormente incrementato la percentuale di cellule T $CD4^+CD8^+INF\text{-}\gamma^+$ spleniche (**p < 0,01** per gli animali immunizzati non trattati con probiotici, **p < 0,01** per *L. plantarum*, **p < 0,001** per *L. gasseri* L6, **p < 0,001** per *L. gasseri* CO-L04). Tuttavia, nessuno dei tre probiotici somministrati per via intranasale ha prodotto un aumento statisticamente significativo della percentuale di linfociti T attivati della milza rispetto ai topi immunizzati ma non trattati con probiotici.

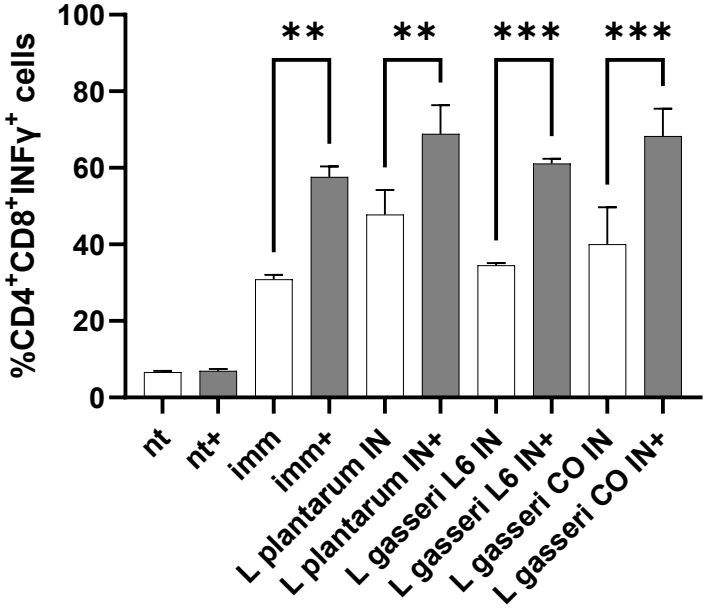

Figura 45. Istogramma dell'analisi statistica delle percentuali di cellule $CD4^+CD8^+IFN\gamma^+$ spleniche nei topi trattati con probiotici somministrati per via intranasale. I campioni sottoposti a *challenge in vitro* sono contraddistinti dal simbolo "**+**" apposto dopo l'indicazione del tipo di trattamento e riportati in grigio; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Il quadro si è rivelato diverso per i topi a cui i probiotici sono stati forniti mediante *gavage* intragastrico. In questo caso, il *challenge* antigenica *in vitro* ha determinato un incremento significativo delle percentuali di cellule T spleniche attivate negli animali immunizzati non trattati con probiotici (**p < 0,001**) e nei gruppi trattati con *L. plantarum* (**p < 0,05**) e *L. gasseri* L6 (**p < 0,01**), ma non nel gruppo assegnato a *L. gasseri* CO-L04. Tutti e tre i probiotici somministrati per via intragastrica hanno generato un aumento significativo della percentuale di cellule T spleniche attivate rispetto al gruppo immunizzato senza alcun probiotico (**p < 0,0001** per *L. plantarum* e *L. gasseri* CO-L04, **p < 0,001** per *L. gasseri* L6). Malgrado ciò, gli effetti dei tre probiotici in tal senso hanno dimostrato di non differire tra loro in maniera significativa.

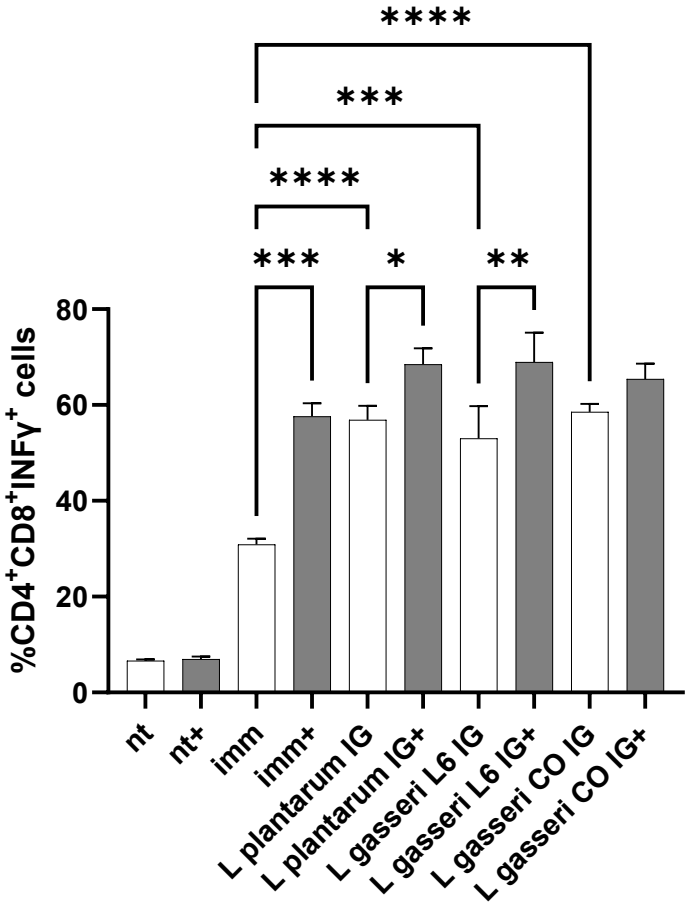

Figura 46. Istogramma dell'analisi statistica delle percentuali di cellule CD4⁺CD8⁺IFNγ⁺ spleniche nei topi trattati con probiotici somministrati mediante *gavage* intragastrico. I campioni sottoposti a *challenge in vitro* sono contraddistinti dal simbolo "**+**" apposto dopo l'indicazione del tipo di trattamento e riportati in grigio; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Cellule B CD19⁺CD27⁺ (linfociti B della memoria)

L'analisi citofluorimetrica delle cellule B della memoria della milza ha evidenziato l'assenza di variazioni significative delle percentuali di tali linfociti per ognuno dei gruppi assegnati ai probiotici per via intranasale rispetto agli animali trattati con il solo vaccino. Le percentuali sono aumentate significativamente con la stimolazione antigenica *in vitro* per tutti i gruppi

assegnati a probiotici (**p < 0,01** per *L. plantarum*, *L. gasseri* L6 e *L. gasseri* CO-L04), come per quello trattato con il solo vaccino (**p < 0,01**).

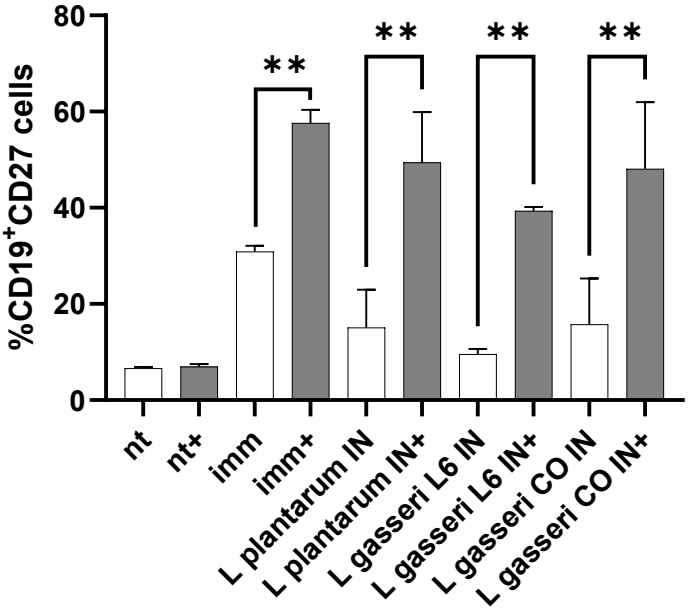

Figura 47. Istogramma dell'analisi statistica delle percentuali di cellule CD19⁺CD27⁺ spleniche nei topi trattati con probiotici somministrati per via intranasale. I campioni sottoposti a *challenge in vitro* sono contraddistinti dal simbolo "**+**" apposto dopo l'indicazione del tipo di trattamento e riportati in grigio; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Ben più variegata è l'immagine che si ricava dall'analisi dei linfociti B della memoria nel caso del *gavage* intragastrico. I probiotici intragastrici non hanno condotto ad alcun effetto adiuvante sulla generazione di cellule B della memoria. Nello specifico, l'immunizzazione senza impiego di probiotici si è rivelata significativamente superiore dopo *challenge in vitro* rispetto all'aggiunta dei tre probiotici (**p < 0,0001** per *L. plantarum*, *L. gasseri* L6 e *L. gasseri* CO-L04) nell'innalzamento delle conte dei linfociti B della memoria. La stimolazione antigenica *in vitro* ha incrementato significativamente le percentuali di linfociti B della memoria in tutti i gruppi trattati con i probiotici (**p < 0,0001** per *L. plantarum*, *L. gasseri* L6 e *L. gasseri* CO-L04) e negli animali assegnati alla sola immunizzazione (**p < 0,0001**).

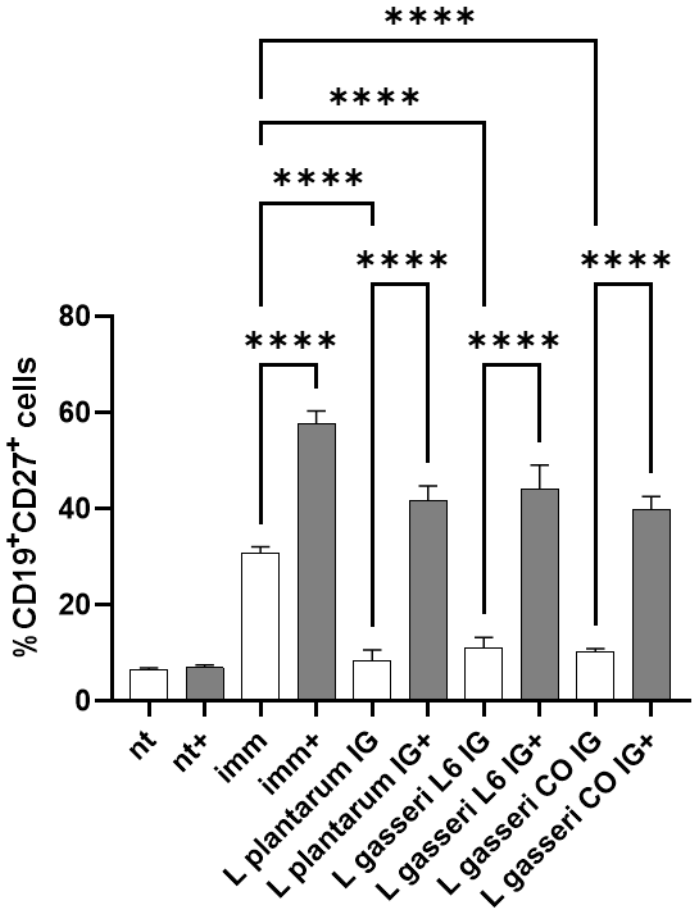

Figura 48. Istogramma dell'analisi statistica delle percentuali di cellule CD19⁺CD27⁺ spleniche nei topi trattati con probiotici somministrati mediante *gavage* intragastrico. I campioni sottoposti a *challenge in vitro* sono contraddistinti dal simbolo "**+**" apposto dopo l'indicazione del tipo di trattamento e riportati in grigio; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Cellule B CD19⁺CD24⁺ (linfociti B attivati)

Nessuno dei probiotici per via intranasale ha permesso di ottenere variazioni significative sulle percentuali dei linfociti B attivati presenti nella milza rispetto al gruppo di topi vaccinati ma non trattati con probiotici. Inoltre, il *challenge in vitro* non ha prodotto incrementi significativi della percentuale di linfociti B CD19⁺CD24⁺ splenici in alcuno dei gruppi trattati con i probiotici somministrati per via intranasale e nemmeno negli animali immunizzati non trattati con probiotici.

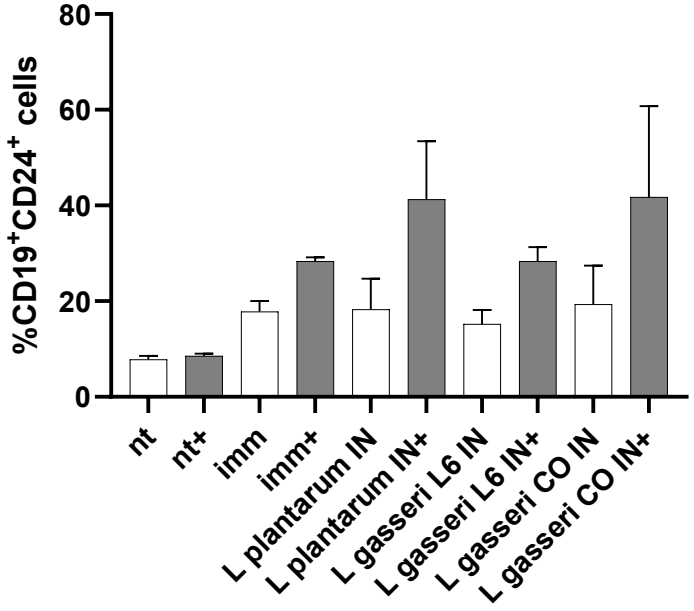

Figura 49. Istogramma dell'analisi statistica delle percentuali di cellule CD19⁺CD24⁺ spleniche nei topi trattati con probiotici somministrati per via intranasale. I campioni sottoposti a *challenge in vitro* sono contraddistinti dal simbolo "**+**" apposto dopo l'indicazione del tipo di trattamento e riportati in grigio; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Anche nel caso del *gavage* intragastrico, nessun probiotico è riuscito ad innalzare significativamente la percentuale di cellule B attivate spleniche. Occorre però puntualizzare che, a differenza di quanto rilevato per la somministrazione intranasale, la stimolazione antigenica *in vitro* delle cellule B spleniche ha indotto un'attivazione significativa dei linfociti B in tutti i gruppi assegnati ai probiotici intragastrici (**p < 0,0001** per *L. plantarum*, **p < 0,001** per *L. gasseri* L6, **p < 0,01** per *L. gasseri* CO-L04). Con il *challenge* antigenico *in vitro* delle cellule B spleniche dei topi immunizzati ma non trattati con probiotico non è invece emerso un aumento significativo delle percentuali dei linfociti attivati B splenici.

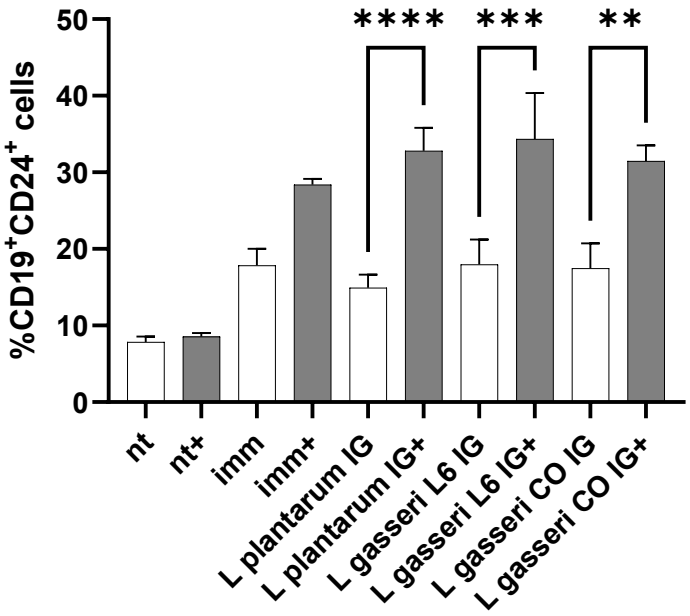

Figura 50. Istogramma dell'analisi statistica delle percentuali di cellule CD19⁺CD24⁺ spleniche nei topi trattati con probiotici somministrati mediante *gavage* intragastrico. I campioni sottoposti a *challenge in vitro* sono contraddistinti dal simbolo "**+**" apposto dopo l'indicazione del tipo di trattamento e riportati in grigio; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Anticorpi

Prima di prendere accuratamente in esame i titoli di anticorpi IgG totali, IgG1 e IgG2a sierici e IgA polmonari, occorre precisare che, come sarà visibile dai grafici che seguono, l'immunizzazione senza trattamento con probiotici ha prodotto livelli di anticorpi IgG totali, IgG1 e IgG2 sierici **non significativamente superiori** ai topi non vaccinati, ma titoli di IgA nel tessuto polmonare **significativamente maggiori** di quelli quantificati negli animali non immunizzati. Questa osservazione sarà importante per comprendere, mediante un approccio prettamente razionale, l'effettiva rilevanza dell'impiego dei probiotici in relazione alle singole risposte umorali analizzate.

Anticorpi IgG sierici totali

I saggi ELISA condotti su campioni di siero hanno messo in luce un incremento statisticamente significativo dei titoli di IgG sieriche virus-specifiche per il gruppo assegnato a *L. plantarum* somministrato per via intranasale rispetto ai topi vaccinati ma non trattati con probiotici (**$p < 0,0001$**). Tale aumento di IgG sieriche indotto dal *L. plantarum* intranasale appare altresì significativamente superiore rispetto ai valori del gruppo trattato con *L. gasseri* CO-L04 per via intranasale (**$p < 0,05$**), ma non si rilevano differenze significative attuando la comparazione con tutti gli altri animali.

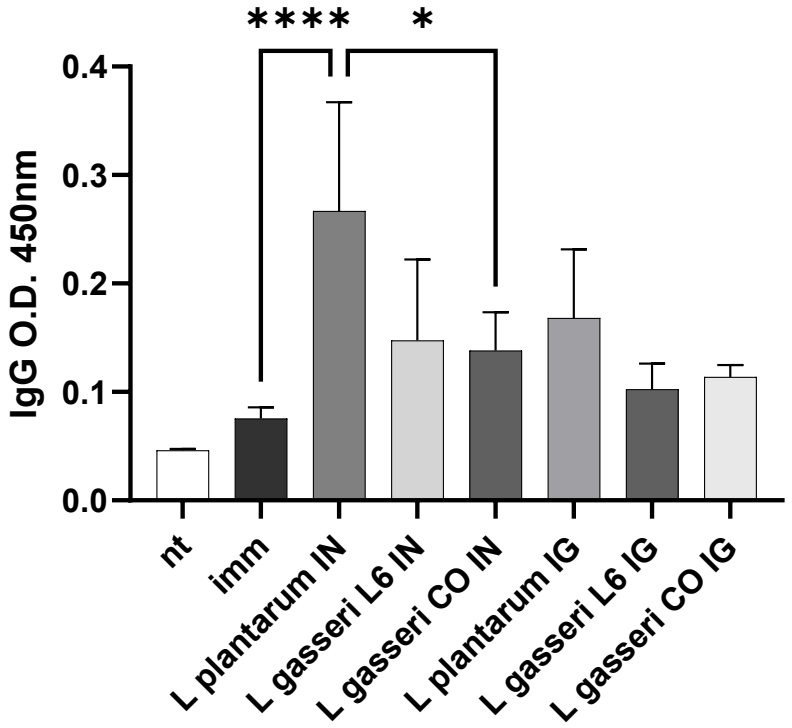

Figura 51. Istogramma dell'analisi statistica dei titoli di IgG totali nel siero. Le sigle "**IN**" e "**IG**", apposte a seguito dell'indicazione del tipo di trattamento, segnalano rispettivamente la via di somministrazione intranasale e il *gavage* intragastrico di ogni probiotico; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Anticorpi IgG1 sierici

Nei topi assegnati al trattamento con *L. plantarum* per via intranasale si è verificato un incremento statisticamente significativo dei titoli di IgG1 sieriche virus-specifiche rispetto a tutti gli altri gruppi di trattamento (**p < 0,01** per *L. plantarum* intragastrico, **p < 0,0001** per *L. gasseri* L6 intranasale, **p < 0,0001** per *L. gasseri* CO-L04 intranasale, **p < 0,0001** per *L. gasseri* L6 intragastrico, **p < 0,0001** per *L. gasseri* CO-L04 intragastrico), inclusi gli animali immunizzati non supplementati con probiotico (**p < 0,0001**). Con la somministrazione mediante *gavage* intragastrico, *L. plantarum* ha dimostrato un aumento significativo delle IgG1 specifiche per il virus rispetto al solo gruppo vaccinato senza i probiotici, e non nei confronti degli animali assegnati agli altri trattamenti.

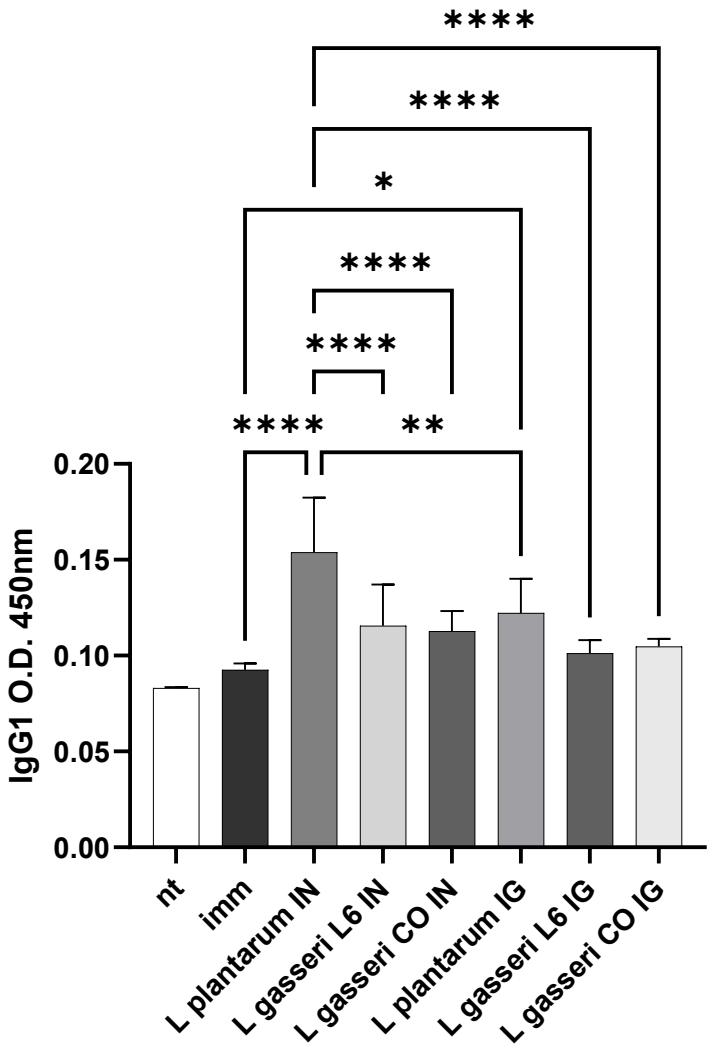

Figura 52. Istogramma dell'analisi statistica dei titoli di IgG1 nel siero. Le sigle "**IN**" e "**IG**", apposte a seguito dell'indicazione del tipo di trattamento, segnalano rispettivamente la via di somministrazione intranasale e il *gavage* intragastrico di ogni probiotico; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Anticorpi IgG2a sierici

Il trattamento con *L. plantarum* per via intranasale ha incrementato significativamente i titoli di IgG2 sieriche virus-specifiche se confrontato con i topi immunizzati senza trattamento con probiotico (**p < 0,01**) e con il gruppo assegnato a *L. gasseri* L6 per via intranasale (**p < 0,05**). In seguito a *gavage* intragastrico, *L. plantarum* ha prodotto livelli di IgG2a specifiche per il virus significativamente più elevati rispetto agli animali vaccinati senza probiotici (**p < 0,0001**) e a ciascuno dei gruppi assegnati al *L. gasseri* CO-L04 intranasale (**p < 0,01**), al *L. gasseri* L6 intranasale (**p < 0,0001**), al *L. gasseri* CO-L04 intragastrico (**p < 0,01**) e al *L. gasseri* L6 intragastrico (**p < 0,05**). La differenza dei titoli di IgG2 virus-specifiche tra il gruppo *L. plantarum* intranasale e il *L. plantarum* intragastrico non appare significativa.

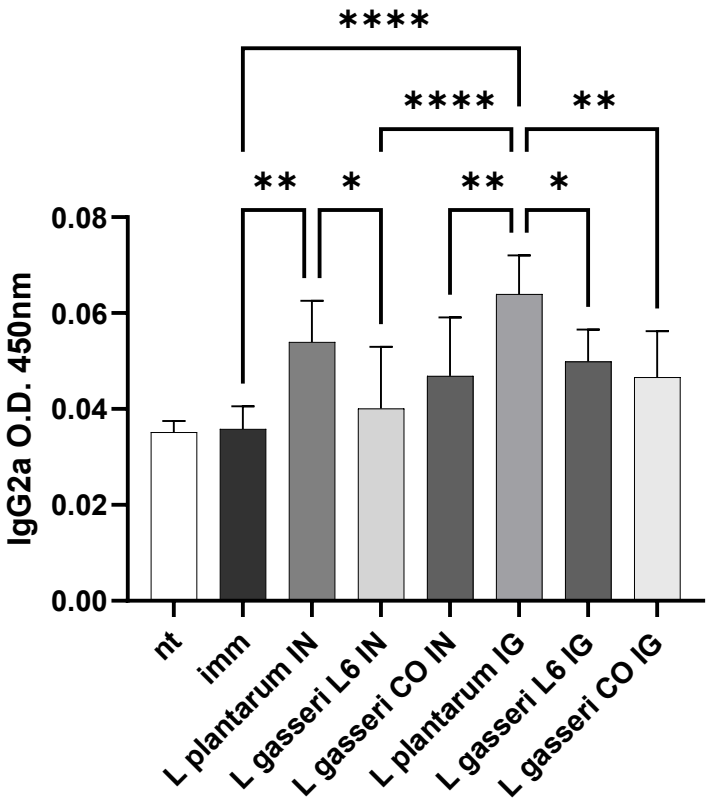

Figura 53. Istogramma dell'analisi statistica dei titoli di IgG2a nel siero. Le sigle "**IN**" e "**IG**", apposte a seguito dell'indicazione del tipo di trattamento, segnalano rispettivamente la via di somministrazione intranasale e il *gavage* intragastrico di ogni probiotico; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

Anticorpi IgA del tessuto polmonare

Tutti i gruppi assegnati ai probiotici e, come precedentemente accennato, quello vaccinato senza probiotico, hanno dimostrato livelli di IgA significativamente maggiori rispetto ai topi non immunizzati (**p < 0,0001** per tutti i gruppi). I titoli di IgA mucosali virus-specifiche del tessuto polmonare dei topi trattati con *L. gasseri* CO-L04 mediante *gavage* intragastrico sono risultati significativamente più elevati rispetto ai livelli di IgA raggiunti con *L. plantarum* e *L. gasseri* L6 a seguito della somministrazione intragastrica di questi ultimi (**p < 0,01** per *L. plantarum* intragastrico e **p < 0,05** per *L. gasseri* L6 intragastrico). Complessivamente, tuttavia, nessuno dei trattamenti con probiotici ha prodotto titoli di IgA polmonari virus-specifiche significativamente diversi rispetto a quelli dei topi sottoposti alla sola immunizzazione. Parimenti, non sono risultate ulteriori apprezzabili differenze tra i vari gruppi di trattamento in merito ai livelli di IgA specifiche per il virus nel tessuto polmonare.

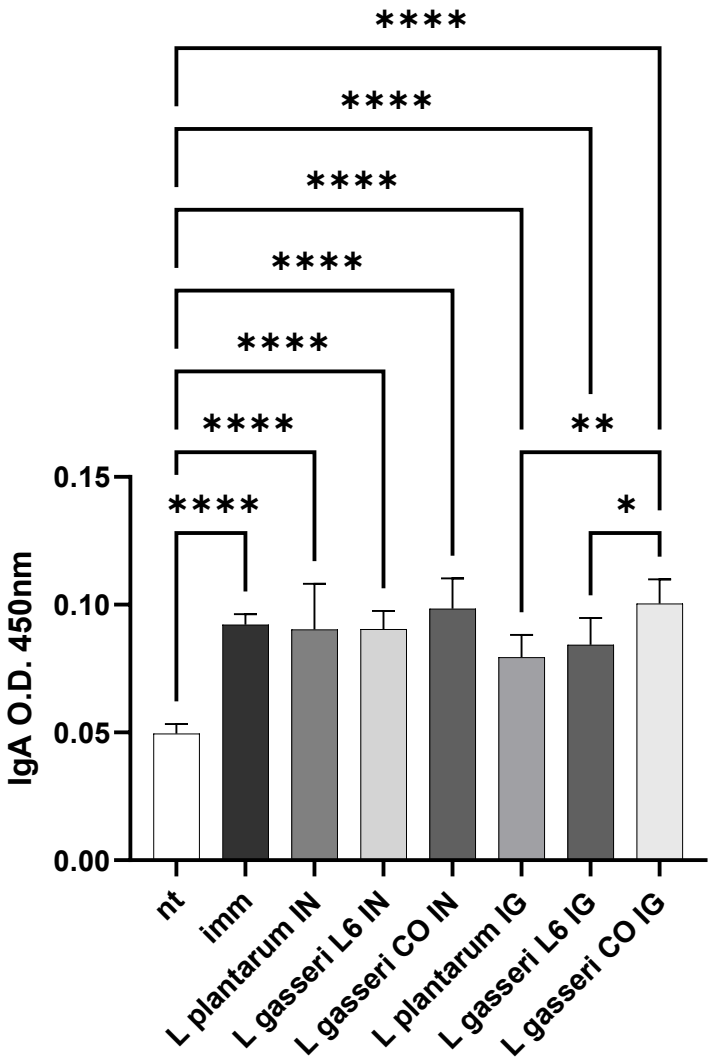

Figura 54. Istogramma dell'analisi statistica dei titoli di IgA nel tessuto polmonare. Le sigle "**IN**" e "**IG**", apposte a seguito dell'indicazione del tipo di trattamento, segnalano rispettivamente la via di somministrazione intranasale e il *gavage* intragastrico di ogni probiotico; "**nt**" corrisponde al gruppo non immunizzato, "**imm**" agli animali immunizzati non trattati con probiotici.

DISCUSSIONE

RISPOSTE CELLULARI

Risposte cellulari T spleniche

Interessanti sono i riscontri che emergono dall'analisi delle cellule T della milza. Da un lato, tra i probiotici somministrati per via intranasale nessuno ha permesso di registrare un effetto adiuvante significativo in tal senso. Dall'altro lato, con il *gavage* intragastrico, tutti i tre ceppi probiotici hanno prodotto un effetto adiuvante significativo sull'attivazione dei linfociti T splenici, in pieno contrasto con i riscontri prodotti dalla somministrazione intranasale. L'attività adiuvante nel *gavage* intragastrico appare pressoché equivalente tra i tre ceppi. Se ne deve concludere che la via di somministrazione dei probiotici ha influito in modo determinante sull'effetto adiuvante sulle risposte cellulari T.

Risposte cellulari B spleniche

I dati relativi alle percentuali di cellule B attivate spleniche non hanno consentito, in ultima analisi, di individuare apprezzabili effetti adiuvanti da parte di alcuno dei tre ceppi di probiotici. Tale considerazione è valida per entrambe le vie di somministrazione. Simili prospettive sono quelle riguardanti i linfociti B della memoria. Invero, si è constatata l'assenza di attività adiuvante da parte dei probiotici somministrati per via intranasale e l'apparentemente paradossale effetto negativo dei probiotici intragastrici sullo sviluppo delle cellule B della memoria della milza rispetto ad animali immunizzati ma non trattati con probiotici. Alla luce di questi dati, si deve ammettere la sostanziale inefficacia adiuvante dei tre ceppi di probiotici sull'attivazione dei linfociti B splenici, facendo riferimento alle due vie di somministrazione impiegate nello studio.

RISPOSTE ANTICORPALI

Risposte anticorpali IgG sieriche

Prospettive più avvincenti emergono dall'interpretazione dei livelli di anticorpi IgG sierici. *L. plantarum* si è rivelato essere l'unico probiotico a detenere un effetto adiuvante significativo, per entrambe le vie di somministrazione, sui livelli di IgG1 e di IgG2a sieriche virus-specifiche singolarmente considerate. Per contro, invece, se si analizzano i titoli di IgG sieriche totali specifiche per i virus vaccinali, si desume che *L. plantarum* ha esercitato un effetto adiuvante significativo esclusivamente per via intranasale. Poiché i titoli di IgG totali, IgG1 e IgG2a sieriche virus-specifiche rilevati nei topi immunizzati ma non assegnati a probiotici non appaiono significativamente più alti di quelli degli animali non vaccinati, è opportuno sottolineare la primaria importanza che l'effetto adiuvante dei probiotici, qualora statisticamente verificato, ha avuto nello sviluppo delle risposte IgG sieriche. Tale constatazione assume particolare rilievo, essendosi appunto dimostrata l'insufficienza della mera vaccinazione in tale ambito della risposta immunitaria nel presente lavoro.

Risposte anticorpali IgA nel tessuto polmonare

L'analisi dei tessuti polmonari non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i livelli di IgA virus-specifiche ottenuti con i diversi trattamenti con probiotici e quelli derivanti dall'immunizzazione senza impiego di probiotici, anche considerando le due diverse vie di somministrazione dei tre ceppi di lattobacilli. Il riscontro più evidente è dunque l'assenza di effetti adiuvanti apprezzabili da parte dei tre probiotici, attraverso entrambe le vie di somministrazione, sulle risposte umorali IgA del polmone.

CONCLUSIONI

Nel presente studio, l'efficacia adiuvante di *L. gasseri* L6 e di *L. gasseri* CO-L04 sulle risposte immunitarie alla vaccinazione antinfluenzale si è rivelata estremamente limitata. Invero, al dì là degli incrementi significativi delle percentuali di linfociti T attivati splenici, registrati peraltro esclusivamente con il *gavage* intragastrico, che questi due ceppi probiotici hanno permesso di conseguire, tutti gli altri aspetti dell'immunità vaccinale esaminati in questo studio non sono stati influenzati apprezzabilmente, se non in maniera occasionalmente negativa, da *L. gasseri* L6 e *L. gasseri* CO-L04. Diverse sono le conclusioni che si possono ricavare dai dati su *L. plantarum*. L'effetto adiuvante di questo probiotico sull'immunità conferita dal vaccino antinfluenzale ha riguardato, in modo statisticamente significativo, le percentuali dei linfociti T attivati della milza, anche se esclusivamente nel *gavage* intragastrico, e i titoli di anticorpi IgG totali, IgG1 e IgG2a virus-specifici sierici. *L. plantarum* non ha invece manifestato efficacia adiuvante sulle percentuali di cellule B attivate e della memoria spleniche, né sui titoli di IgA virus-specifiche del tessuto polmonare. Seppure complessivamente modesti, gli effetti adiuvanti di *L. plantarum* sulla vaccinazione antinfluenzale si sono rivelati nettamente superiori rispetto a quelli esercitati da *L. gasseri* L6 e *L. gasseri* CO-L04. Come esposto nelle precedenti Sezioni, la via di somministrazione dei probiotici ha influito in più istanze sugli esiti delle analisi condotte. Più volte, infatti, un probiotico somministrato per via intranasale ha dato luogo a riscontri quantitativamente o qualitativamente diversi rispetto a quelli del *gavage* intragastrico dello stesso ceppo. Il caso più emblematico è probabilmente quello dei linfociti B della memoria, sulle cui percentuali la somministrazione intranasale non ha portato ad alcuna differenza effettiva per tutti i probiotici, mentre un decremento significativo delle percentuali di tali cellule è stato osservato con tutti e tre i ceppi per via intragastrica. I riscontri appena discussi non devono affatto sorprendere, essendo state rilevate, in numerosi studi, differenze di efficacia tra la via di somministrazione intranasale e il *gavage* intragastrico per lo stesso probiotico in talune applicazioni (530–533). Le spiegazioni di questi fenomeni potrebbero essere molteplici. Tali variazioni potrebbero anzitutto essere imputabili all'effettiva quantità di batteri che giunge inalterata al sito d'azione. Nel caso della via intranasale, si può supporre che ogni dose di probiotico pervenga in maniera pressoché totale alla mucosa nasale, assunte le caratteristiche anatomiche delle cavità nasali. Il quadro diviene ben più complesso nel *gavage* intragastrico. La parziale, ma inevitabile, degradazione del probiotico nello stomaco e nei segmenti successivi del tubo digerente rende infatti imprevedibile l'esatto quantitativo di microrganismi che possono raggiungere allo stato vitale l'intestino tenue e il crasso. Sebbene la dose intragastrica sia stata opportunamente formulata in considerazione di tali aspetti, le quantità di cellule batteriche che colonizzano effettivamente l'intestino non sono direttamente determinabili. A incidere su questi quantitativi sono infatti una pluralità di fattori, tra cui il pH gastrico, gli enzimi digestivi, gli acidi biliari e la velocità del transito gastrointestinale. Tuttavia, anche aspetti di natura qualitativa potrebbero essere implicati nelle differenze degli effetti adiuvanti tra le due vie di somministrazione. Nell'Introduzione si è accennato ad un possibile ruolo dell'IL-6 prodotta nel MALT nella mediazione degli effetti adiuvanti dei probiotici (353,355–357). Addizionalmente, è stata esposta anche la capacità di *L. plantarum* di esercitare un responso pro-infiammatorio mediato da NF-κB nel duodeno umano (358). Si potrebbe ipotizzare che questi meccanismi, documentati in letteratura, mediante i quali i probiotici potrebbero esplicare effetti adiuvanti, possano differire in natura o in intensità tra i diversi tessuti linfoidi associati alle mucose a parità di ceppo probiotico. Qualora tali discrepanze sussistessero, le differenze tra gli effetti adiuvanti indotti tramite la via intranasale e quelli prodotti grazie al *gavage* intragastrico dello stesso microrganismo

potrebbero, almeno in parte, essere spiegate. Un altro fattore da tenere presente in tal merito è la diversità del microbiota intestinale murino rispetto a quello della cavità nasale (534). I rapporti che un determinato probiotico sarebbe in grado di stabilire con il microbiota intestinale potrebbero dunque divergere dalle relazioni che esso stesso instaurerebbe con il microbiota nasale. Conseguentemente, anche la resistenza alla colonizzazione da parte dei probiotici varierebbe tra i due distretti mucosali. In ultima istanza, anche le differenze istologiche e funzionali tra le due mucose vanno considerate. La mucosa nasale murina comprende quattro tipi di epitelio (535). Il vestibolo è ricoperto da epitelio pavimentoso stratificato, leggermente cheratinizzato. La maggior parte della mucosa non olfattiva delle cavità nasali murine è costituita da epitelio respiratorio il quale, morfologicamente, si presenta ciliato e colonnare pseudostratificato. L'epitelio olfattivo, colonnare pseudostratificato, contiene i neuroni olfattivi e il suo spessore è maggiore rispetto a quello respiratorio. Tra l'epitelio del vestibolo e quello respiratorio si riscontra un epitelio di transizione, non ciliato e dall'aspetto cuboidale oppure colonnare (535). L'ampia eterogeneità istologica della mucosa nasale si contrappone alla maggiore uniformità delle mucose dell'intestino tenue e del colon, composte da un epitelio a singolo strato.

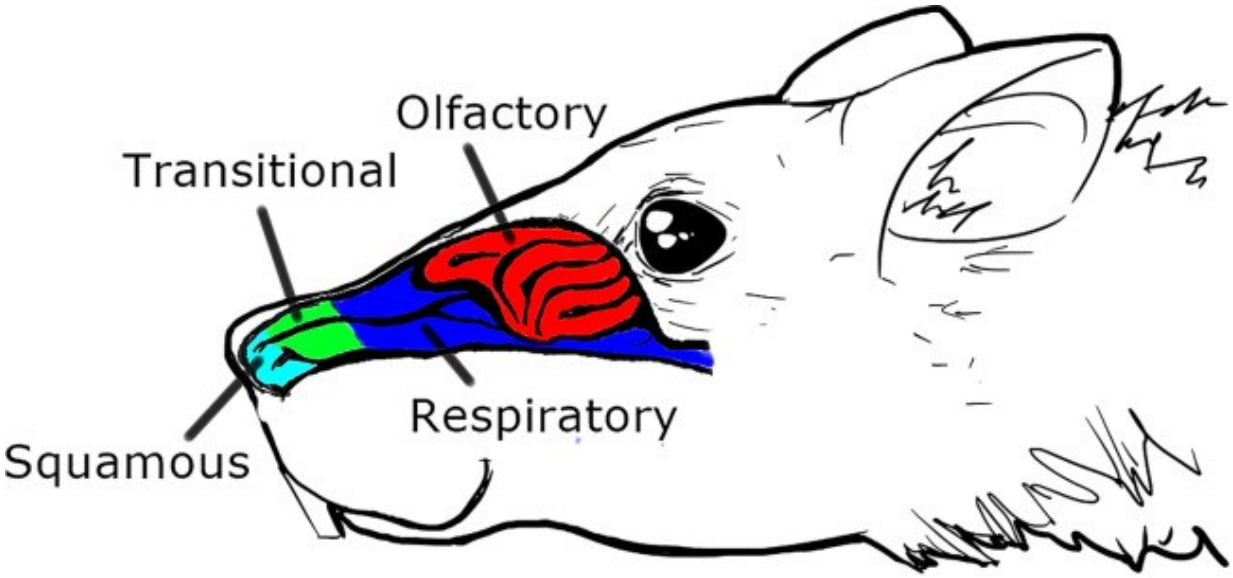

Figura 55. Organizzazione anatomica dei diversi tipi di epitelio nella cavità nasale murina (535)**.**

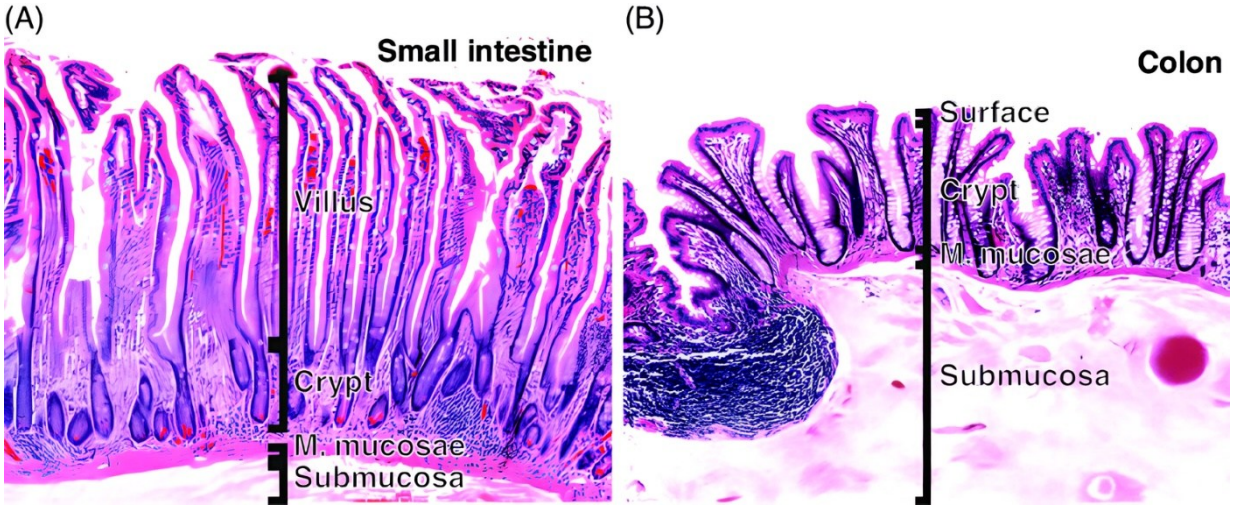

Figura 56. Mucosa dell'intestino tenue (A) e mucosa del colon (B) (536)**.** Sezioni istologiche delle mucose dell'intestino tenue e del colon, ossia i principali siti di azione dei probiotici somministrati mediante *gavage* intragastrico. Si osservino le differenze tra l'anatomia di queste mucose e quella delle mucose della cavità nasale murina.

SEZIONE BIBLIOGRAFICA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunologia Cellulare e Molecolare. 4th ed. Piccin; 2001.

2. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. Immunology. 2018 May;154(1):3–20.

3. Cabeza-Cabrerizo M, Cardoso A, Minutti CM, Pereira da Costa M, Reis e Sousa C. Dendritic Cells Revisited. Annu Rev Immunol. 2021 Apr 26;39:131–66.

4. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. Immunity. 2019 Jan 15;50(1):37–50.

5. SGUL lymres. Wikimedia Commons. 2021 [cited 2025 Nov 10]. File:Anatomy of the lymphatic system.jpg. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anatomy_of_the_lymphatic_system.jpg

6. Crumbie L, Mytilinaios D. Kenhub. 2023 [cited 2025 Aug 4]. Bone marrow histology. Available from: https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/histology-of-bone-marrow

7. Sorenson RL, Brelje TC. Histology Guide. 2005 [cited 2025 Sep 25]. Lymphoid System. Available from: https://histologyguide.com/gallery/gallery.html

8. Null M, Arbor TC, Agarwal M. Anatomy, Lymphatic System [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2025 Nov 27]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513247/

9. Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC. Comparative Aspects of Splenic Microcirculatory Pathways in Mammals: The Region Bordering the White Pulp. Scanning Microsc. 1993;7.

10. Steiniger B, Barth P, Hellinger A. The Perifollicular and Marginal Zones of the Human Splenic White Pulp. Am J Pathol. 2001 Aug;159(2):501–12.

11. Steiniger B, Barth P, Hellinger A. The Perifollicular and Marginal Zones of the Human Splenic White Pulp. Am J Pathol. 2001 Aug;159(2):501–12.

12. Steiniger B, Barth P, Herbst B, Hartnell A, Crocker PR. The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. Immunology. 1997 Oct;92(2):307–16.

13. Udroiu I. Evolution of sinusal and non-sinusal spleens of Mammals. Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy. 2006;17.

14. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol. 2005 Aug;5(8):606–16.

15. Doebel T, Voisin B, Nagao K. Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. Trends Immunol. 2017 Nov;38(11):817–28.

16. Sato Y, Silina K, van den Broek M, Hirahara K, Yanagita M. The roles of tertiary lymphoid structures in chronic diseases. Nat Rev Nephrol. 2023 Aug 12;19(8):525–37.

17. Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, et al. In Situ B Cell-Mediated Immune Responses and Tubulointerstitial Inflammation in Human Lupus Nephritis. The Journal of Immunology. 2011 Feb 1;186(3):1849–60.

18. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, et al. Cell Distance Mapping Identifies Functional T Follicular Helper Cells in Inflamed Human Renal Tissue. Sci Transl Med. 2014 Apr 2;6(230).

19. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, et al. Molecular Heterogeneity in Acute Renal Allograft Rejection Identified by DNA Microarray Profiling. New England Journal of Medicine. 2003 Jul 10;349(2):125–38.

20. Bagnasco SM, Tsai W, Rahman MH, Kraus ES, Barisoni L, Vega R, et al. CD20-Positive Infiltrates in Renal Allograft Biopsies with Acute Cellular Rejection Are Not Associated with Worse Graft Survival. American Journal of Transplantation. 2007 Aug;7(8):1968–73.

21. Lee YH, Sato Y, Saito M, Fukuma S, Saito M, Yamamoto S, et al. Advanced Tertiary Lymphoid Tissues in Protocol Biopsies are Associated with Progressive Graft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. Journal of the American Society of Nephrology. 2022 Jan;33(1):186–200.

22. Stock AD, Der E, Gelb S, Huang M, Weidenheim K, Ben-Zvi A, et al. Tertiary lymphoid structures in the choroid plexus in neuropsychiatric lupus. JCI Insight. 2019 Jun 6;4(11).

23. Singh P, Coskun ZZ, Goode C, Dean A, Thompson-Snipes L, Darlington G. Lymphoid neogenesis and immune infiltration in aged liver. Hepatology. 2008 May;47(5):1680–90.

24. Elyahu Y, Hekselman I, Eizenberg-Magar I, Berner O, Strominger I, Schiller M, et al. Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes. Sci Adv. 2019 Aug 2;5(8).

25. Fukushima Y, Sakamoto K, Matsuda M, Yoshikai Y, Yagita H, Kitamura D, et al. cis interaction of CD153 with TCR/CD3 is crucial for the pathogenic activation of senescence-associated T cells. Cell Rep. 2022 Sep;40(12):111373.

26. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Encyclopaedia Britannica. 2025 [cited 2025 Sep 18]. antibody. Available from: Encyclopaedia Britannica

27. PORTER RR. The hydrolysis of rabbit y-globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem J. 1959 Sep;73(1):119–26.

28. SUNY OER services Microbiology [Internet]. [cited 2025 Sep 25]. Major Histocompatibility Complexes and Antigen-Presenting Cells. Available from: https://courses.lumenlearning.com/suny-microbiology/chapter/major-histocompatibility-complexes-and-antigen-presenting-cells/

29. Pober JS, Merola J, Liu R, Manes TD. Antigen Presentation by Vascular Cells. Front Immunol. 2017;8:1907.

30. Jollow KC, Zimring JC, Sundstrom JB, Ansari AA. CD40 ligation induced phenotypic and functional expression of CD80 by human cardiac microvascular endothelial cells. Transplantation. 1999 Aug 15;68(3):430–9.

31. Prat A, Biernacki K, Becher B, Antel JP. B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. J Neuropathol Exp Neurol. 2000 Feb;59(2):129–36.

32. Omari KI, Dorovini-Zis K. Expression and function of the costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in an in vitro model of the human blood--brain barrier. J Neuroimmunol. 2001 Feb 1;113(1):129–41.

33. Tan PH, Chan C, Xue SA, Dong R, Ananthesayanan B, Manunta M, et al. Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. Atherosclerosis. 2004 Apr;173(2):171–83.

34. Lozanoska-Ochser B, Klein NJ, Huang GC, Alvarez RA, Peakman M. Expression of CD86 on human islet endothelial cells facilitates T cell adhesion and migration. J Immunol. 2008 Nov 1;181(9):6109–16.

35. Epperson DE, Pober JS. Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. J Immunol. 1994 Dec 15;153(12):5402–12.

36. Denton MD, Geehan CS, Alexander SI, Sayegh MH, Briscoe DM. Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. J Exp Med. 1999 Aug 16;190(4):555–66.

37. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK. Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. J Am Soc Nephrol. 2003 May;14(5):1336–48.

38. Wosen JE, Mukhopadhyay D, Macaubas C, Mellins ED. Epithelial MHC Class II Expression and Its Role in Antigen Presentation in the Gastrointestinal and Respiratory Tracts. Front Immunol. 2018;9:2144.

39. Cunningham AC, Milne DS, Wilkes J, Dark JH, Tetley TD, Kirby JA. Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings. J Cell Sci. 1994 Feb;107 (Pt 2):443–9.

40. Glanville AR, Tazelaar HD, Theodore J, Imoto E, Rouse R V., Baldwin JC, et al. The Distribution of MHC Class I and II Antigens on Bronchial Epithelium. American Review of Respiratory Disease. 1989 Feb;139(2):330–4.

41. Kallenberg CG, Schilizzi BM, Beaumont F, Poppema S, De Leij L, The TH. Expression of class II MHC antigens on alveolar epithelium in fibrosing alveolitis. Clin Exp Immunol. 1987 Jan;67(1):182–90.

42. Tanaka H, Maeda K, Nakamura Y, Azuma M, Yanagawa H, Sone S. CD40 and IFN-gamma dependent T cell activation by human bronchial epithelial cells. J Med Invest. 2001 Feb;48(1–2):109–17.

43. Papi A, Stanciu LA, Papadopoulos NG, Teran LM, Holgate ST, Johnston SL. Rhinovirus infection induces major histocompatibility complex class I and costimulatory molecule upregulation on respiratory epithelial cells. J Infect Dis. 2000 May;181(5):1780–4.

44. Kaneko Y, Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, Hagimoto N, Hara N. B7-1, B7-2 and class II MHC molecules in idiopathic pulmonary fibrosis and bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia. Eur Respir J. 2000 Jan;15(1):49–55.

45. Chiba M, Iizuka M, Masamune O. Ubiquitous expression of HLA-DR antigens on human small intestinal epithelium. Gastroenterol Jpn. 1988 Apr;23(2):109–16.

46. Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1991 Jan;100(1):3–12.

47. Kelly J, O'Farrelly C, O'Mahony C, Weir DG, Feighery C. Immunoperoxidase demonstration of the cellular composition of the normal and coeliac

small bowel. Clin Exp Immunol. 1987 Apr;68(1):177–88.

48. Kirby WN, Parr EL. The occurrence and distribution of H-2 antigens on mouse intestinal epithelial cells. J Histochem Cytochem. 1979 Mar;27(3):746–50.

49. Parr EL, McKenzie IFC. Demonstration of Ia antigens on mouse intestinal epithelial cells by immunoferritin labeling. Immunogenetics. 1979 Dec;8(1):499–508.

50. Byrne B, Madrigal-Estebas L, McEvoy A, Carton J, Doherty DG, Whelan A, et al. Human duodenal epithelial cells constitutively express molecular components of antigen presentation but not costimulatory molecules. Hum Immunol. 2002 Nov;63(11):977–86.

51. Selby WS, Janossy G, Mason DY, Jewell DP. Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol. 1983 Sep;53(3):614–8.

52. Daar AS, Fuggle S V, Ting A, Fabre JW. Anomolous expression of HLA-DR antigens on human colorectal cancer cells. The Journal of Immunology. 1982 Aug 1;129(2):447–9.

53. Iizuka M, Chiba M, Ohta H, Kodama K, Igarashi K, Arakawa H, et al. Expression of HLA-DR antigens on colonic epithelium in ulcerative colitis. Gastroenterol Jpn. 1987 Oct;22(5):571–7.

54. Steiniger B, Falk P, Lohmüller M, van der Meide PH. Class II MHC antigens in the rat digestive system. Normal distribution and induced expression after interferon-gamma treatment in vivo. Immunology. 1989 Dec;68(4):507–13.

55. Sanderson IR, Ouellette AJ, Carter EA, Walker WA, Harmatz PR. Differential regulation of B7 mRNA in enterocytes and lymphoid cells. Immunology. 1993 Jul;79(3):434–8.

56. Nakazawa A, Watanabe M, Kanai T, Yajima T, Yamazaki M, Ogata H, et al. Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa. Gastroenterology. 1999 Sep;117(3):536–45.

57. Bloom S, Simmons D, Jewell DP. Adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-3 and B7 are not expressed by epithelium in normal or inflamed colon. Clin Exp Immunol. 1995 Jul;101(1):157–63.

58. Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. J Immunol. 1994 Mar 15;152(6):2675–85.

59. London CA, Lodge MP, Abbas AK. Functional Responses and Costimulator Dependence of Memory CD4+ T Cells. The Journal of Immunology. 2000 Jan 1;164(1):265–72.

60. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol. 2015 Apr 27;15(4):203–16.

61. Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997 Aug 19;94(17):8970–5.

62. Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. J Immunol. 1996 Apr 1;156(7):2361–4.

63. Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. Nat Rev Immunol. 2009 Jul;9(7):503–13.

64. Samuel Scott Perdue. Encyclopaedia Britannica. 2025 [cited 2025 Sep 20]. T-cell antigen receptors. Available from: https://www.britannica.com/science/immune-system/T-cell-antigen-receptors

65. Mak TW, Saunders ME. The T Cell Receptor: Structure of Its Proteins and Genes. In: The Immune Response. Elsevier; 2006. p. 311–40.

66. Swartz MA, Lund AW. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 24;12(3):210–9.

67. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, et al. TGF-β signaling in health, disease and therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2024 Mar 22;9(1):61.

68. Zlotnik A, Yoshie O. The Chemokine Superfamily Revisited. Immunity. 2012 May;36(5):705–16.

69. Ulvmar MH, Hub E, Rot A. Atypical chemokine receptors. Exp Cell Res. 2011 Mar;317(5):556–68.

70. Matti C, Salnikov A, Artinger M, D'Agostino G, Kindinger I, Uguccioni M, et al. ACKR4 Recruits GRK3 Prior to β-Arrestins but Can Scavenge Chemokines in the Absence of β-Arrestins. Front Immunol. 2020 Apr 22;11.

71. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN-γ in tumor progression and regression: a review. Biomark Res. 2020 Dec 29;8(1):49.

72. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol. 2008 Jul;8(7):523–32.

73. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35

contributes to regulatory T-cell function. Nature. 2007 Nov;450(7169):566–9.

74. Coffman RL, Lebman DA, Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. J Exp Med. 1989 Sep 1;170(3):1039–44.

75. Defrance T, Vanbervliet B, Brière F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. J Exp Med. 1992 Mar 1;175(3):671–82.

76. Tang J, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Ryan DH. TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors. The Journal of Immunology. 1997 Jul 1;159(1):117–25.

77. Lee G, Ellingsworth LR, Gillis S, Wall R, Kincade PW. Beta transforming growth factors are potential regulators of B lymphopoiesis. J Exp Med. 1987 Nov 1;166(5):1290–9.

78. Koroleva EP, Fu YX, Tumanov A V. Lymphotoxin in physiology of lymphoid tissues – Implication for antiviral defense. Cytokine. 2018 Jan;101:39–47.

79. Lund FE, Partida-Sánchez S, Lee BO, Kusser KL, Hartson L, Hogan RJ, et al. Lymphotoxin-α-Deficient Mice Make Delayed, But Effective, T and B Cell Responses to Influenza. The Journal of Immunology. 2002 Nov 1;169(9):5236–43.

80. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, Kusser K, Tighe MP, Klonowski KD, et al. Persistence and Responsiveness of Immunologic Memory in the Absence of Secondary Lymphoid Organs. Immunity. 2006 Oct;25(4):643–54.

81. Zeng M, Paiardini M, Engram JC, Beilman GJ, Chipman JG, Schacker TW, et al. Critical role of CD4 T cells in maintaining lymphoid tissue structure for immune cell homeostasis and reconstitution. Blood. 2012 Aug 30;120(9):1856–67.

82. Benedict CA, Banks TA, Senderowicz L, Ko M, Britt WJ, Angulo A, et al. Lymphotoxins and Cytomegalovirus Cooperatively Induce Interferon-β, Establishing Host-Virus Détente. Immunity. 2001 Oct;15(4):617–26.

83. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. The Journal of Immunology. 2007 Apr 15;178(8):5245–52.

84. Metcalf D. The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications. Cancer. 1990 May 15;65(10):2185–95.

85. Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen IS. Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. Science. 1988 Sep 23;241(4873):1673–5.

86. Ray P, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Ray A. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. Ann N Y Acad Sci. 2010 Jan 12;1183(1):104–22.

87. Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. Physiol Rev. 2012 Oct;92(4):1619–49.

88. Metcalf D, Mifsud S, Di Rago L. Stem Cell Factor Can Stimulate the Formation of Eosinophils by Two Types of Murine Eosinophil Progenitor Cells. Stem Cells. 2002 Sep;20(5):460–9.

89. Oliveira SHP, Taub DD, Nagel J, Smith R, Hogaboam CM, Berlin A, et al. Stem cell factor induces eosinophil activation and degranulation: mediator release and gene array analysis. Blood. 2002 Dec 15;100(13):4291–7.

90. Matos ME, Schnier GS, Beecher MS, Ashman LK, William DE, Caligiuri MA. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. J Exp Med. 1993 Sep 1;178(3):1079–84.

91. Zamisch M, Moore-Scott B, Su D ming, Lucas PJ, Manley N, Richie ER. Ontogeny and Regulation of IL-7-Expressing Thymic Epithelial Cells. The Journal of Immunology. 2005 Jan 1;174(1):60–7.

92. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. Nat Immunol. 2007 Nov 23;8(11):1255–65.

93. Witte PL, Frantsve LM, Hergott M, Rahbe SM. Cytokine production and heterogeneity of primary stromal cells that support B lymphopoiesis. Eur J Immunol. 1993 Aug 9;23(8):1809–17.

94. Shinoda K, Hirahara K, Iinuma T, Ichikawa T, Suzuki AS, Sugaya K, et al. Thy1 + IL-7 + lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016 May 17;113(20).

95. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, et al. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. Journal of Clinical Investigation. 1995 Jun 1;95(6):2945–53.

96. Sawa Y, Arima Y, Ogura H, Kitabayashi C, Jiang JJ, Fukushima T, et al. Hepatic Interleukin-7 Expression Regulates T Cell Responses. Immunity. 2009 Mar;30(3):447–57.

97. Hudson M, Newman RH, Rorie CJ, Holloman BL, Kaufman HL, Rabkin SD, et al. Promoting the

therapeutic potential of interleukin-7 (IL-7) by expression in viral vectors. Cancer Gene Ther. 2025 Nov 16;32(11):1166–76.

98. Podolska MJ, Grützmann R, Pilarsky C, Bénard A. IL-3: key orchestrator of inflammation. Front Immunol. 2024 Jun 13;15.

99. Itoh N, Yonehara S, Schreurs J, Gorman DM, Maruyama K, Ishii A, et al. Cloning of an Interleukin-3 Receptor Gene: a Member of a Distinct Receptor Gene Family. Science (1979). 1990 Jan 19;247(4940):324–7.

100. Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Lopez AF, Williamson DJ. Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice. Blood. 1986 Jul;68(1):46–57.

101. Sabbaghi F, Ullner L, Bohn T, Hahlbrock J, Bopp T, Schmitt E, et al. In Activated Murine Mast Cells, NFATc2 Is Critical for the Production of Autocrine IL-3, Thereby Promoting the Expression of IL-9. The Journal of Immunology. 2021 Jan 1;206(1):67–76.

102. Füreder W, Bankl HC, Toth J, Walchshofer S, Sperr W, Agis H, et al. Immunophenotypic and functional characterization of human tonsillar mast cells. J Leukoc Biol. 1997 May 1;61(5):592–9.

103. Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP. Human Basophils Secrete IL-3: Evidence of Autocrine Priming for Phenotypic and Functional Responses in Allergic Disease. The Journal of Immunology. 2009 Feb 15;182(4):2432–8.

104. Renner K, Metz S, Metzger AM, Neumayer S, Schmidbauer K, Talke Y, et al. Expression of IL-3 receptors and impact of IL-3 on human T and B cells. Cell Immunol. 2018 Dec;334:49–60.

105. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand. J Exp Med. 1997 Mar 17;185(6):1101–12.

106. Ebisawa M, Liu MC, Yamada T, Kato M, Lichtenstein LM, Bochner BS, et al. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. II. Potentiation of eosinophil transendothelial migration by eosinophil-active cytokines. J Immunol. 1994 May 1;152(9):4590–6.

107. Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF, et al. Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. Journal of Clinical Investigation. 1988 Jun 1;81(6):1986–92.

108. Thapa P, Farber DL. The Role of the Thymus in the Immune Response. Thorac Surg Clin. 2019 May;29(2):123–31.

109. Pearse G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. Toxicol Pathol. 2006 Aug 1;34(5):504–14.

110. Rossi FM V, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, et al. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. Nat Immunol. 2005 Jun 8;6(6):626–34.

111. Krueger A, Willenzon S, Łyszkiewicz M, Kremmer E, Förster R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. Blood. 2010 Mar 11;115(10):1906–12.

112. Liu C, Saito F, Liu Z, Lei Y, Uehara S, Love P, et al. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. Blood. 2006 Oct 15;108(8):2531–9.

113. Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA, Bhandoola A. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. Blood. 2010 Mar 11;115(10):1897–905.

114. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. J Exp Med. 1994 Nov 1;180(5):1955–60.

115. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, et al. Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1. Immunity. 1999 May;10(5):547–58.

116. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nat Immunol. 2001 Nov 15;2(11):1032–9.

117. Das R, Sant'Angelo DB, Nichols KE. Transcriptional control of invariant NKT cell development. Immunol Rev. 2010 Nov 25;238(1):195–215.

118. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. J Exp Med. 2001 Jul 16;194(2):127–34.

119. Ueno T, Saito F, Gray DHD, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, et al. CCR7 Signals Are Essential for Cortex–Medulla Migration of Developing Thymocytes. J Exp Med. 2004 Aug 16;200(4):493–505.

120. Ushiki T. A scanning electron-microscopic study of the rat thymus with special reference to cell types and migration of lymphocytes into the general circulation. Cell Tissue Res. 1986 May;244(2).

121. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. Nat Rev Immunol. 2006 Feb 1;6(2):127–35.

122. Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. Nat Rev Immunol. 2004 Apr;4(4):278–89.

123. Bertoletti A, Sette A, Chisari F V., Penna A, Levrero M, Carli M De, et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. Nature. 1994 Jun;369(6479):407–10.

124. Nishikomori R, Usui T, Wu CY, Morinobu A, O'Shea JJ, Strober W. Activated STAT4 Has an Essential Role in Th1 Differentiation and Proliferation That Is Independent of Its Role in the Maintenance of IL-12Rβ2 Chain Expression and Signaling. The Journal of Immunology. 2002 Oct 15;169(8):4388–98.

125. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. Nat Immunol. 2008 Mar 21;9(3):310–8.

126. Yoshimoto T, Paul WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. J Exp Med. 1994 Apr 1;179(4):1285–95.

127. Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE. IL-4 secreted from individual naive CD4+ T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation. Eur J Immunol. 2002 May;32(5):1428.

128. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. J Exp Med. 1995 Nov 1;182(5):1591–6.

129. van Panhuys N, Klauschen F, Germain RN. T-Cell-Receptor-Dependent Signal Intensity Dominantly Controls CD4+ T Cell Polarization In Vivo. Immunity. 2014 Jul;41(1):63–74.

130. Koh CH, Lee S, Kwak M, Kim BS, Chung Y. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. Exp Mol Med. 2023 Nov 1;55(11):2287–99.

131. Liu J, Zhang K, Zhang X, Guan F, Zeng H, Kubo M, et al. Immunoglobulin class-switch recombination: Mechanism, regulation, and related diseases. MedComm (Beijing). 2024 Aug 13;5(8).

132. Abd El-Aleem SA, Saber EA, Aziz NM, El-Sherif H, Abdelraof AM, Djouhri L. Follicular dendritic cells. J Cell Physiol. 2022 Apr 17;237(4):2019–33.

133. Kashimura M. The human spleen as the center of the blood defense system. Int J Hematol. 2020 Aug 16;112(2):147–58.

134. Ly A, Hansen DS. Development of B Cell Memory in Malaria. Front Immunol. 2019 Apr 2;10.

135. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. Nat Rev Immunol. 2013 Feb;13(2):118–32.

136. Möller G. Antigens: Thymus Independent. In: Encyclopedia of Life Sciences. Wiley; 2001.

137. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. Nat Rev Immunol. 2015 Mar;15(3):149–59.

138. Yang Y, Ghosn EEB, Cole LE, Obukhanych T V, Sadate-Ngatchou P, Vogel SN, et al. Antigen-specific memory in B-1a and its relationship to natural immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 3;109(14):5388–93.

139. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. Immunity. 2004 Sep;21(3):379–90.

140. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae. Immunity. 2005 Jul;23(1):7–18.

141. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. Nat Rev Immunol. 2002 May;2(5):323–35.

142. Spencer J, Finn T, Pulford KA, Mason DY, Isaacson PG. The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. Clin Exp Immunol. 1985 Dec;62(3):607–12.

143. Tierens A, Delabie J, Michiels L, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. Blood. 1999 Jan 1;93(1):226–34.

144. Dono M, Zupo S, Leanza N, Melioli G, Fogli M, Melagrana A, et al. Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents. J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):5596–604.

145. Chen Y, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, et al. Defective Microarchitecture of the Spleen Marginal Zone and Impaired Response to a Thymus-Independent Type 2 Antigen in Mice Lacking Scavenger Receptors MARCO and SR-A. The Journal of Immunology. 2005 Dec 15;175(12):8173–80.

146. Kang YS, Do Y, Lee HK, Park SH, Cheong C, Lynch RM, et al. A Dominant Complement Fixation Pathway for Pneumococcal Polysaccharides Initiated by SIGN-R1 Interacting with C1q. Cell. 2006 Apr;125(1):47–58.

147. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nat Rev Immunol. 2009 Jan;9(1):15–27.

148. Pone EJ, Zhang J, Mai T, White CA, Li G, Sakakura JK, et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-κB pathway. Nat Commun. 2012 Apr 3;3(1):767.

149. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, et al. B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. Nat Immunol. 2012 Feb 25;13(2):170–80.

150. Balázs M, Martin F, Zhou T, Kearney JF. Blood Dendritic Cells Interact with Splenic Marginal Zone B Cells to Initiate T-Independent Immune Responses. Immunity. 2002 Sep;17(3):341–52.

151. Pack M, Trumpfheller C, Thomas D, Park CG, Granelli-Piperno A, Münz C, et al. DEC-205/CD205 + dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. Immunology. 2008 Mar 18;123(3):438–46.

152. Ogembo JG, Milner DA, Mansfield KG, Rodig SJ, Murphy GF, Kutok JL, et al. SIRPα/CD172a and FHOD1 Are Unique Markers of Littoral Cells, a Recently Evolved Major Cell Population of Red Pulp of Human Spleen. The Journal of Immunology. 2012 May 1;188(9):4496–505.

153. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. Immunity. 2001 May;14(5):617–29.

154. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD, Hogarth PM. The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. Front Immunol. 2019 Mar 19;10.

155. Joshi T, Ganesan LP, Cao X, Tridandapani S. Molecular analysis of expression and function of hFcγRIIbl and b2 isoforms in myeloid cells. Mol Immunol. 2006 Mar;43(7):839–50.

156. Xia YC, Schuliga M, Shepherd M, Powell M, Harris T, Langenbach SY, et al. Functional Expression of IgG-Fc Receptors in Human Airway Smooth Muscle Cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 May;44(5):665–72.

157. Ganesan LP, Kim J, Wu Y, Mohanty S, Phillips GS, Birmingham DJ, et al. FcγRIIb on Liver Sinusoidal Endothelium Clears Small Immune Complexes. The Journal of Immunology. 2012 Nov 15;189(10):4981–8.

158. Girard JP, Moussion C, Förster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. Nat Rev Immunol. 2012 Nov 28;12(11):762–73.

159. Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, et al. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. Nat Immunol. 2005 May 17;6(5):497–506.

160. Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. J Exp Med. 2005 Jan 17;201(2):291–301.

161. Nakai A, Hayano Y, Furuta F, Noda M, Suzuki K. Control of lymphocyte egress from lymph nodes through β2-adrenergic receptors. Journal of Experimental Medicine. 2014 Dec 15;211(13):2583–98.

162. Salmi M, Jalkanen S. Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. Immunol Rev. 2005 Aug 28;206(1):100–13.

163. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, et al. α4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. Cell. 1995 Feb;80(3):413–22.

164. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. Nature. 1993 Dec;366(6456):695–8.

165. Steeber DA, Tang ML, Zhang XQ, Müller W, Wagner N, Tedder TF. Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse Peyer's patches requires overlapping expression of L-selectin and beta7 integrin. J Immunol. 1998 Dec 15;161(12):6638–47.

166. Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig MC, Richelme M, et al. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor γδ+ gut intraepithelial lymphocytes. Blood. 2001 Nov 1;98(9):2626–32.

167. Pabst O, Ohl L, Wendland M, Wurbel MA, Kremmer E, Malissen B, et al. Chemokine Receptor CCR9 Contributes to the Localization of Plasma Cells to the Small Intestine. J Exp Med. 2004 Feb 2;199(3):411–6.

168. Hosoe N, Miura S, Watanabe C, Tsuzuki Y, Hokari R, Oyama T, et al. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninflamed intestinal mucosa. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2004 Mar;286(3):G458–66.

169. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. Nat Rev Immunol. 2003 Oct;3(10):822–9.

170. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Förster R, Lipp M, Littman DR, et al. Chemokine Requirements for B Cell Entry to Lymph Nodes and Peyer's Patches. J Exp Med. 2002 Jul 1;196(1):65–75.

171. ERICSSON A, ARYA A, AGACE W. CCL25 Enhances CD103-Mediated Lymphocyte Adhesion

to E-Cadherin. Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec 12;1029(1):334–6.

172. Mowat AMcI. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat Rev Immunol. 2003 Apr;3(4):331–41.

173. Kraal G, Mebius R. New Insights into the Cell Biology of the Marginal Zone of the Spleen. In 2006. p. 175–215.

174. Kraal G, Schornagel K, Streeter PR, Holzmann B, Butcher EC. Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. Am J Pathol. 1995 Sep;147(3):763–71.

175. van Ewijk W, Nieuwenhuis P. Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. Experientia. 1985 Feb;41(2):199–208.

176. Mitchell J. Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. Immunology. 1973 Jan;24(1):93–107.

177. Goldschneider I, McGregor DD. MIGRATION OF LYMPHOCYTES AND THYMOCYTES IN THE RAT. J Exp Med. 1968 Jan 1;127(1):155–68.

178. Nolte MA, ’t Hoen ENM, van Stijn A, Kraal G, Mebius RE. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. Eur J Immunol. 2000 Feb;30(2):626–34.

179. Brelińska R, Pilgrim C, Reisert I. Pathways of lymphocyte migration within the periarterial lymphoid sheath of rat spleen. Cell Tissue Res. 1984 Jun;236(3):661–7.

180. Pabst R, Geisler R. The route of migration of lymphocytes from blood to spleen and mesenteric lymph nodes in the pig. Cell Tissue Res. 1981 Dec;221(2):361–70.

181. Grayson MH, Hotchkiss RS, Karl IE, Holtzman MJ, Chaplin DD. Intravital microscopy comparing T lymphocyte trafficking to the spleen and the mesenteric lymph node. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2003 Jun 1;284(6):H2213–26.

182. Tadayon S, Dunkel J, Takeda A, Halle O, Karikoski M, Gerke H, et al. Clever-1 contributes to lymphocyte entry into the spleen via the red pulp. Sci Immunol. 2019 Mar 22;4(33).

183. Chauveau A, Pirgova G, Cheng HW, De Martin A, Zhou FY, Wideman S, et al. Visualization of T Cell Migration in the Spleen Reveals a Network of Perivascular Pathways that Guide Entry into T Zones. Immunity. 2020 May 19;52(5):794-807.e7.

184. Steiniger BS, Pfeffer H, Gaffling S, Lobachev O. The human splenic microcirculation is entirely open as shown by 3D models in virtual reality. Sci Rep. 2022 Oct 1;12(1):16487.

185. Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. Immunity. 2006 Dec;25(6):989–1001.

186. Bajénoff M, Glaichenhaus N, Germain RN. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. J Immunol. 2008 Sep 15;181(6):3947–54.

187. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7;97(23):12694–9.

188. Nakano H, Mori S, Yonekawa H, Nariuchi H, Matsuzawa A, Kakiuchi T. A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. Blood. 1998 Apr 15;91(8):2886–95.

189. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. Cell. 1999 Oct 1;99(1):23–33.

190. Okada T, Cyster JG. CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):2973–8.

191. Huang JH, Cárdenas-Navia LI, Caldwell CC, Plumb TJ, Radu CG, Rocha PN, et al. Requirements for T lymphocyte migration in explanted lymph nodes. J Immunol. 2007 Jun 15;178(12):7747–55.

192. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. Cell. 1996 Dec 13;87(6):1037–47.

193. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature. 2000 Jul 20;406(6793):309–14.

194. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. Nat Rev Immunol. 2009 Sep;9(9):618–29.

195. Kabashima K, Haynes NM, Xu Y, Nutt SL, Allende ML, Proia RL, et al. Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. J Exp Med. 2006 Nov 27;203(12):2683–90.

196. Hunter L, Ruedas-Torres I, Agulló-Ros I, Rayner E, Salguero FJ. Comparative pathology of experimental pulmonary tuberculosis in animal models. Front Vet Sci. 2023 Oct 12;10.

197. Daniele T, Hackmann Y, Ritter AT, Wenham M, Booth S, Bossi G, et al. A Role for Rab7 in the Movement of Secretory Granules in Cytotoxic T Lymphocytes. Traffic. 2011 Jul 21;12(7):902–11.

198. Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, et al. Rab27a Is Required for Regulated Secretion in Cytotoxic T Lymphocytes. J Cell Biol. 2001 Feb 19;152(4):825–34.

199. Khurana D, Leibson PJ. Regulation of lymphocyte-mediated killing by GTP-binding proteins. J Leukoc Biol. 2003 Mar 1;73(3):333–8.

200. Sadeghalvad M, Mohammadi-Motlagh HR, Rezaei N. Structure and Function of the Immune System. In: Encyclopedia of Infection and Immunity. Elsevier; 2022. p. 24–38.

201. Tallima H, Azzazy HME, El Ridi R. Cell surface sphingomyelin: key role in cancer initiation, progression, and immune evasion. Lipids Health Dis. 2021 Dec 31;20(1):150.

202. SLiva2016. Wikimedia Commons. 2015 [cited 2025 Nov 25]. File:Membrane Attack Complex (Terminal Complement Complex C5b-9).png. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Membrane_Attack_Complex_(Terminal_Complement_Complex_C5b-9).png

203. Strugnell RA, Wijburg OLC. The role of secretory antibodies in infection immunity. Nat Rev Microbiol. 2010 Sep 9;8(9):656–67.

204. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. Clin Dev Immunol. 2012;2012:1–13.

205. Simister NE. Human placental Fc receptors and the trapping of immune complexes. Vaccine. 1998 Aug;16(14–15):1451–5.

206. Bright NA, Ockleford CD. Cytotrophoblast cells: a barrier to maternofetal transmission of passive immunity. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1995 Sep 1;43(9):933–44.

207. Wessel RE, Dolatshahi S. Regulators of placental antibody transfer through a modeling lens. Nat Immunol. 2024 Nov 8;25(11):2024–36.

208. Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. J Immunol. 1996 Oct 15;157(8):3317–22.

209. Saji F. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. Rev Reprod. 1999 May 1;4(2):81–9.

210. Kiskova T, Mytsko Y, Schepelmann M, Helmer H, Fuchs R, Miedl H, et al. Expression of the neonatal Fc-receptor in placental-fetal endothelium and in cells of the placental immune system. Placenta. 2019 Mar;78:36–43.

211. Cumberland P, Shulman CE, Maple PAC, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV Infection and Placental Malaria Reduce Transplacental Antibody Transfer and Tetanus Antibody Levels in Newborns in Kenya. J Infect Dis. 2007 Aug 15;196(4):550–7.

212. Verhasselt V, Tellier J, Carsetti R, Tepekule B. Antibodies in breast milk: Pro-bodies designed for healthy newborn development. Immunol Rev. 2024 Nov 22;328(1):192–204.

213. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol. 2007 Sep 17;7(9):715–25.

214. Ward ES. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. Int Immunol. 2003 Feb 1;15(2):187–95.

215. Shah U, Dickinson BL, Blumberg RS, Simister NE, Lencer WI, Walker AW. Distribution of the IgG Fc Receptor, FcRn, in the Human Fetal Intestine. Pediatr Res. 2003 Feb;53(2):295–301.

216. ISRAEL EJ, TAYLOR S, WU Z, MIZOGUCHI E, BLUMBERG RS, BHAN A, et al. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. Immunology. 1997 Sep 30;92(1):69–74.

217. Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, et al. MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages, and Dendritic Cells. The Journal of Immunology. 2001 Mar 1;166(5):3266–76.

218. Blumberg RS, Koss T, Story CM, Barisani D, Polischuk J, Lipin A, et al. A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes. Journal of Clinical Investigation. 1995 May 1;95(5):2397–402.

219. Liang Y. Pathogenicity and virulence of influenza. Virulence. 2023 Dec 31;14(1).

220. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. Nat Rev Dis Primers. 2018 Jun 28;4(1):3.

221. Noda T, Murakami S, Nakatsu S, Imai H, Muramoto Y, Shindo K, et al. Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. Nat Commun. 2018 Jan 4;9(1):54.

222. Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo YM, Cárdenas WB, Gale M, García-Sastre A. Inhibition of Retinoic Acid-Inducible Gene I-Mediated Induction of Beta Interferon by the NS1 Protein of Influenza A Virus. J Virol. 2007 Jan 15;81(2):514–24.

223. Rajsbaum R, Albrecht RA, Wang MK, Maharaj NP, Versteeg GA, Nistal-Villán E, et al. Species-Specific Inhibition of RIG-I Ubiquitination and IFN Induction by the Influenza A Virus NS1 Protein. PLoS Pathog. 2012 Nov 29;8(11):e1003059.

224. Nemeroff ME, Barabino SML, Li Y, Keller W, Krug RM. Influenza Virus NS1 Protein Interacts with the Cellular 30 kDa Subunit of CPSF and Inhibits 3′ End Formation of Cellular Pre-mRNAs. Mol Cell. 1998 Jun;1(7):991–1000.

225. Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzveig DR, Wang Y, Faria PA, et al. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 Feb 6;104(6):1853–8.

226. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, et al. An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. Science (1979). 2012 Jul 13;337(6091):199–204.

227. Crotta S, Davidson S, Mahlakoiv T, Desmet CJ, Buckwalter MR, Albert ML, et al. Type I and Type III Interferons Drive Redundant Amplification Loops to Induce a Transcriptional Signature in Influenza-Infected Airway Epithelia. PLoS Pathog. 2013 Nov 21;9(11):e1003773.

228. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help. Science (1979). 2003 Apr 11;300(5617):339–42.

229. McKinstry KK, Strutt TM, Kuang Y, Brown DM, Sell S, Dutton RW, et al. Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms. Journal of Clinical Investigation. 2012 Aug 1;122(8):2847–56.

230. Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. Nature. 2008 May 29;453(7195):667–71.

231. Gerhard W, Yewdell J, Frankel ME, Webster R. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. Nature. 1981 Apr;290(5808):713–7.

232. Heaton NS, Sachs D, Chen CJ, Hai R, Palese P. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013 Dec 10;110(50):20248–53.

233. Henry C, Palm AKE, Krammer F, Wilson PC. From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine. Trends Immunol. 2018 Jan;39(1):70–9.

234. Ekiert DC, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. Curr Opin Virol. 2012 Apr;2(2):134–41.

235. Wohlbold T, Krammer F. In the Shadow of Hemagglutinin: A Growing Interest in Influenza Viral Neuraminidase and Its Role as a Vaccine Antigen. Viruses. 2014 Jun 23;6(6):2465–94.

236. Wan H, Gao J, Xu K, Chen H, Couzens LK, Rivers KH, et al. Molecular Basis for Broad Neuraminidase Immunity: Conserved Epitopes in Seasonal and Pandemic H1N1 as Well as H5N1 Influenza Viruses. J Virol. 2013 Aug 15;87(16):9290–300.

237. Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. Nat Med. 1999 Oct;5(10):1157–63.

238. Seibert CW, Rahmat S, Krause JC, Eggink D, Albrecht RA, Goff PH, et al. Recombinant IgA Is Sufficient To Prevent Influenza Virus Transmission in Guinea Pigs. J Virol. 2013 Jul 15;87(14):7793–804.

239. Lowen AC, Steel J, Mubareka S, Carnero E, García-Sastre A, Palese P. Blocking Interhost Transmission of Influenza Virus by Vaccination in the Guinea Pig Model. J Virol. 2009 Apr;83(7):2803–18.

240. Waithman J, Mintern JD. Dendritic cells and influenza A virus infection. Virulence. 2012 Nov 15;3(7):603–8.

241. GeurtsvanKessel CH, Bergen IM, Muskens F, Boon L, Hoogsteden HC, Osterhaus ADME, et al. Both Conventional and Interferon Killer Dendritic Cells Have Antigen-Presenting Capacity during Influenza Virus Infection. PLoS One. 2009 Sep 28;4(9):e7187.

242. Mount AM, Smith CM, Kupresanin F, Stoermer K, Heath WR, Belz GT. Multiple Dendritic Cell Populations Activate CD4+ T Cells after Viral Stimulation. PLoS One. 2008 Feb 27;3(2):e1691.

243. Ho AWS, Prabhu N, Betts RJ, Ge MQ, Dai X, Hutchinson PE, et al. Lung CD103+ Dendritic Cells Efficiently Transport Influenza Virus to the Lymph Node and Load Viral Antigen onto MHC Class I for Presentation to CD8 T Cells. The Journal of Immunology. 2011 Dec 1;187(11):6011–21.

244. Ingulli E, Funatake C, Jacovetty EL, Zanetti M. Cutting Edge: Antigen Presentation to CD8 T Cells after Influenza A Virus Infection. The Journal of Immunology. 2009 Jan 1;182(1):29–33.

245. Sung SSJ, Fu SM, Rose CE, Gaskin F, Ju ST, Beaty SR. A Major Lung CD103 (αE)-β7 Integrin-Positive Epithelial Dendritic Cell Population Expressing Langerin and Tight Junction Proteins. The Journal of Immunology. 2006 Feb 15;176(4):2161–72.

246. Kim TS, Braciale TJ. Respiratory Dendritic Cell Subsets Differ in Their Capacity to Support the Induction of Virus-Specific Cytotoxic CD8+ T Cell Responses. PLoS One. 2009 Jan 15;4(1):e4204.

247. Ballesteros-Tato A, León B, Lund FE, Randall TD. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8+ T cell responses to influenza. Nat Immunol. 2010 Mar 24;11(3):216–24.

248. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature. 1998 Mar;392(6671):86–9.

249. Topham DJ, Tripp RA, Doherty PC. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. J Immunol. 1997 Dec 1;159(11):5197–200.

250. McGill J, Legge KL. Cutting Edge: Contribution of Lung-Resident T Cell Proliferation to the Overall Magnitude of the Antigen-Specific CD8 T Cell Response in the Lungs following Murine Influenza Virus Infection. The Journal of Immunology. 2009 Oct 1;183(7):4177–81.

251. McGill J, Van Rooijen N, Legge KL. Protective influenza-specific CD8 T cell responses require interactions with dendritic cells in the lungs. J Exp Med. 2008 Jul 7;205(7):1635–46.

252. Mould JA, Paterson RG, Takeda M, Ohigashi Y, Venkataraman P, Lamb RA, et al. Influenza B Virus BM2 Protein Has Ion Channel Activity that Conducts Protons across Membranes. Dev Cell. 2003 Jul;5(1):175–84.

253. Horvath CM, Williams MA, Lamb RA. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. EMBO J. 1990 Aug;9(8):2639–47.

254. Smyk JM, Szydłowska N, Szulc W, Majewska A. Evolution of Influenza Viruses—Drug Resistance, Treatment Options, and Prospects. Int J Mol Sci. 2022 Oct 13;23(20):12244.

255. Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, et al. Clinical Features of Influenza C Virus Infection in Children. J Infect Dis. 2006 May;193(9):1229–35.

256. Lowen AC. It's in the mix: Reassortment of segmented viral genomes. PLoS Pathog. 2018 Sep 13;14(9):e1007200.

257. Fournié G, Guitian J, Desvaux S, Cuong VC, Dung DH, Pfeiffer DU, et al. Interventions for avian influenza A (H5N1) risk management in live bird market networks. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013 May 28;110(22):9177–82.

258. Vincent A, Awada L, Brown I, Chen H, Claes F, Dauphin G, et al. Review of Influenza <scp>A</scp> Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. Zoonoses Public Health. 2014 Feb 5;61(1):4–17.

259. Neumann G, Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium. Influenza Other Respir Viruses. 2011 May;5(3):157–66.

260. Lee CT, Slavinski S, Schiff C, Merlino M, Daskalakis D, Liu D, et al. Outbreak of Influenza A(H7N2) Among Cats in an Animal Shelter With Cat-to-Human Transmission—New York City, 2016. Clinical Infectious Diseases. 2017 Nov 13;65(11):1927–9.

261. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RAM, Amonsin A, Payungporn S, et al. Avian Influenza H5N1 in Tigers and Leopards. Emerg Infect Dis. 2004 Dec;10(12):2189–91.

262. Al Hikmani H, Spalton A, Zafar-ul Islam M, al-Johany A, Sulayem M, Al-Duais M, et al. Panthera pardus ssp. nimr, Arabian Leopard. 2023.

263. Perkins LEL, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. Avian Dis. 2002;46(1):53–63.

264. Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. Nature. 2008 May 16;453(7195):615–9.

265. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, et al. The Global Circulation of Seasonal Influenza A (H3N2) Viruses. Science (1979). 2008 Apr 18;320(5874):340–6.

266. Bahl J, Nelson MI, Chan KH, Chen R, Vijaykrishna D, Halpin RA, et al. Temporally structured metapopulation dynamics and persistence of influenza A H3N2 virus in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011 Nov 29;108(48):19359–64.

267. World Health Organisation [Internet]. 2025 [cited 2025 Jul 1]. Influenza (seasonal). Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)

268. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. The Lancet. 2011 Dec;378(9807):1917–30.

269. Sellers SA, Hagan RS, Hayden FG, Fischer WA. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. Influenza Other Respir Viruses. 2017 Sep 13;11(5):372–93.

270. Duchini A, Viernes ME, Nyberg LM, Hendry RM, Pockros PJ. Hepatic Decompensation in Patients With Cirrhosis During Infection With Influenza A. Arch Intern Med. 2000 Jan 10;160(1):113.

271. Papic N, Pangercic A, Vargovic M, Barsic B, Vince A, Kuzman I. Liver involvement during influenza infection: perspective on the 2009 influenza pandemic. Influenza Other Respir Viruses. 2012 May 23;6(3).

272. Whitworth JR, Mack CL, O'Connor JA, Narkewicz MR, Mengshol S, Sokol RJ. Acute Hepatitis and Liver Failure Associated With Influenza A Infection in Children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006 Oct;43(4):536–8.

273. Fislová T, Gocník M, Sládková T, Ďurmanová V, Rajčáni J, Varečková E, et al. Multiorgan distribution of human influenza A virus strains observed in a mouse model. Arch Virol. 2009 Mar 3;154(3):409–19.

274. Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004 Feb 3;101(5):1356–61.

275. Taubenberger JK, Morens DM. The Pathology of Influenza Virus Infections. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2008 Feb 1;3(1):499–522.

276. Savoy ML, Vivian EM. MSD Manual - Professional Version. 2025 [cited 2025 Jul 12]. Passive Immunization. Available from: https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/immunization/passive-immunization

277. Note for Guidance on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP); 2002.

278. Savoy ML, Vivian EM. MSD Manual - Professional Version. 2024 [cited 2025 Jul 7]. Overview of Immunization. Available from: https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/immunization/overview-of-immunization?query=overview%20of%20immunization

279. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. Nat Rev Immunol. 2021 Feb 22;21(2):83–100.

280. National Health Service [Internet]. 2023 [cited 2025 Nov 25]. Rabies - Vaccination. Available from: https://www.nhs.uk/conditions/rabies/vaccination/#:~:text=How%20the%20rabies%20vaccine%20is,fully%20protect%20everyone%20from%20rabies.

281. World Health Organization [Internet]. 2024 [cited 2025 Nov 25]. Tetanus: immunization. Available from: https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tetanus-immunization

282. Savoy ML, Vivian EM. MSD Manual - Professional Version. 2025 [cited 2025 Nov 26]. Human Papillomavirus (HPV) Vaccine. Available from: https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/immunization/human-papillomavirus-hpv-vaccine?_gl=1*fupfl7*_up*MQ..*_ga*MTUxMzA2MTQ1Mi4xNzY0MTcyMTI1*_ga_CJ792HFYYC*czE3NjQxNzIxMjQkbzEkZzAkdDE3NjQxNzIxMjkkajU1JGwwJGgw

283. Savoy ML, Vivian EM. MSD Manual - Professional Version. 2025 [cited 2025 Nov 26]. Hepatitis B (HepB) Vaccine. Available from: https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/immunization/hepatitis-b-hepb-vaccine?_gl=1*1jr0325*_up*MQ..*_ga*MTUxMzA2MTQ1Mi4xNzY0MTcyMTI1*_ga_CJ792HFYYC*czE3NjQxNzIxMjQkbzEkZzAkdDE3NjQxNzIxMjQkajYwJGwwJGgw

284. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. Nat Rev Immunol. 2009 Apr;9(4):287–93.

285. Wilkins AL, Kazmin D, Napolitani G, Clutterbuck EA, Pulendran B, Siegrist CA, et al. AS03- and MF59-Adjuvanted Influenza Vaccines in Children. Front Immunol. 2017 Dec 13;8.

286. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. Nat Rev Cancer. 2021 Jun 27;21(6):360–78.

287. Lee KW, Yam JWP, Mao X. Dendritic Cell Vaccines: A Shift from Conventional Approach to New Generations. Cells. 2023 Aug 25;12(17):2147.

288. Savoy ML, Vivian EM. MSD Manual - Professional Version. 2025 [cited 2025 Nov 27]. Hepatitis A (HepA) Vaccine. Available from: https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/immunization/hepatitis-a-hepa-vaccine

289. Wara DW. Host Defense Against Streptococcus pneumoniae: The Role of the Spleen. Clinical Infectious Diseases. 1981 Mar 1;3(2):299–309.

290. Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M. CD4 + T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005 Mar 29;102(13):4848–53.

291. Henry B, Baclic O. Summary of the NACI Update on the Recommended Use of Hepatitis B Vaccine. Canada Communicable Disease Report. 2017 May 4;43(5):104–6.

292. Hallberg P, Smedje H, Eriksson N, Kohnke H, Daniilidou M, Öhman I, et al. Pandemrix-induced narcolepsy is associated with genes related to immunity and neuronal survival. EBioMedicine. 2019 Feb;40:595–604.

293. Who Needs a Flu Vaccine [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 8]. Available from: https://www.cdc.gov/flu/vaccines/vaccinations.html

294. Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 11]. Available from: https://www.cdc.gov/flu/vaccine-process/vaccine-selection.html

295. Bella A, Puzelli S. Istituto Superiore di Sanità. 2024 [cited 2025 Jul 11]. Influenza - Vaccini disponibili. Available from: https://www.epicentro.iss.it/influenza/vaccini-disponibili

296. Types of seasonal influenza vaccine [Internet]. 2010 [cited 2025 Jul 10]. Available from: https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/types-of-seasonal-influenza-vaccine#:~:text=systemic%20adverse%20events.-,Live%20attenuated%20influenza%20vaccines%20(LAIV),to%20symptoms%20of%20influenza%20infection.

297. Subbarao K. Live Attenuated Cold-Adapted Influenza Vaccines. Cold Spring Harb Perspect Med. 2021 Sep;11(9):a038653.

298. Belshe RB, Gruber WC, Mendelman PM, Cho I, Reisinger K, Block SL, et al. Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine. J Pediatr. 2000 Feb;136(2):168–75.

299. Mendelman PM, Rappaport R, Cho I, Block S, Gruber W, August M, et al. LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE INDUCES CROSS-REACTIVE ANTIBODY RESPONSES IN CHILDREN AGAINST AN A/FUJIAN/411/2002-LIKE H3N2 ANTIGENIC VARIANT STRAIN. Pediatr Infect Dis J. 2004 Nov;23(11):1053–5.

300. Caspard H, Mallory RM, Yu J, Ambrose CS. Live-Attenuated Influenza Vaccine Effectiveness in Children From 2009 to 2015–2016: A Systematic Review and Meta-Analysis. Open Forum Infect Dis. 2017 Jul 1;4(3).

301. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2024-2025 northern hemisphere influenza season. 2024 Feb.

302. Van Hul M, Cani PD, Petitfils C, De Vos WM, Tilg H, El-Omar EM. What defines a healthy gut microbiome? Gut. 2024 Nov;73(11):1893–908.

303. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. Signal Transduct Target Ther. 2022 Apr 23;7(1):135.

304. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature. 2012 Sep 12;489(7415):231–41.

305. Candela M, Biagi E, Maccaferri S, Turroni S, Brigidi P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. Trends Microbiol. 2012 Aug;20(8):385–91.

306. Cani PD. Gut microbiota — at the intersection of everything? Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Jun 26;14(6):321–2.

307. Cani PD, Moens de Hase E, Van Hul M. Gut Microbiota and Host Metabolism: From Proof of Concept to Therapeutic Intervention. Microorganisms. 2021 Jun 15;9(6):1302.

308. Donowitz JR, Parikh HI, Taniuchi M, Gilchrist CA, Haque R, Kirkpatrick BD, et al. Increased Fecal Lactobacillus Is Associated With a Positive Glucose Hydrogen Breath Test in Bangladeshi Children. Open Forum Infect Dis. 2019 Jul 1;6(7).

309. Li J, Zhang R, Ma J, Tang S, Li Y, Li Y, et al. Mucosa-Associated Microbial Profile Is Altered in Small Intestinal Bacterial Overgrowth. Front Microbiol. 2021 Jul 30;12.

310. Pokharel P, Dhakal S, Dozois CM. The Diversity of Escherichia coli Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. Microorganisms. 2023 Jan 30;11(2):344.

311. Tran SC, Bryant KN, Cover TL. The *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island as a determinant of gastric cancer risk. Gut Microbes. 2024 Dec 31;16(1).

312. Bagnoli F, Buti L, Tompkins L, Covacci A, Amieva MR. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005 Nov 8;102(45):16339–44.

313. Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, Morikawa H, et al. Helicobacter pylori CagA Phosphorylation-Independent Function in Epithelial Proliferation and Inflammation. Cell Host Microbe. 2009 Jan;5(1):23–34.

314. Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 Is a Key Mediator of Helicobacter pylori CagA Protein Activities. Mol Cell. 2002 Oct;10(4):745–55.

315. Villanueva-Millan MJ, Leite G, Wang J, Morales W, Parodi G, Pimentel ML, et al. Methanogens and Hydrogen Sulfide Producing Bacteria Guide Distinct Gut Microbe Profiles and Irritable Bowel Syndrome Subtypes. American Journal of Gastroenterology. 2022 Dec;117(12):2055–66.

316. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR-γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. Science (1979). 2017 Aug 11;357(6351):570–5.

317. Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. Gut. 1980 Sep 1;21(9):793–8.

318. Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, Keestra AM, et al. Host-Derived Nitrate Boosts Growth of *E. coli* in the Inflamed Gut. Science (1979). 2013 Feb 8;339(6120):708–11.

319. Ivanov II, Tuganbaev T, Skelly AN, Honda K. T Cell Responses to the Microbiota. Annu Rev Immunol. 2022 Apr 26;40(1):559–87.

320. Dupraz L, Magniez A, Rolhion N, Richard ML, Da Costa G, Touch S, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids regulate IL-17 production by mouse and human intestinal γδ T cells. Cell Rep. 2021 Jul;36(1):109332.

321. Schulthess J, Pandey S, Capitani M, Rue-Albrecht KC, Arnold I, Franchini F, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. Immunity. 2019 Feb;50(2):432-445.e7.

322. Wang R, Tang R, Li B, Ma X, Schnabl B, Tilg H. Gut microbiome, liver immunology, and liver diseases. Cell Mol Immunol. 2021 Jan 14;18(1):4–17.

323. Leinwand JC, Paul B, Chen R, Xu F, Sierra MA, Paluru MM, et al. Intrahepatic microbes govern liver immunity by programming NKT cells. Journal of Clinical Investigation. 2022 Apr 15;132(8).

324. Mohanty I, Allaband C, Mannochio-Russo H, El Abiead Y, Hagey LR, Knight R, et al. The changing metabolic landscape of bile acids – keys to metabolism and immune regulation. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2024 Jul 4;21(7):493–516.

325. Fuchs CD, Trauner M. Role of bile acids and their receptors in gastrointestinal and hepatic pathophysiology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2022 Jul 14;19(7):432–50.

326. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network. Cell. 2006 Aug;126(4):789–99.

327. Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, et al. <scp>TGR</scp> 5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by *in vitro* differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. Immunology. 2013 May 8;139(1):19–29.

328. Perino A, Pols TWH, Nomura M, Stein S, Pellicciari R, Schoonjans K. TGR5 reduces macrophage migration through mTOR-induced C/EBPβ differential translation. Journal of Clinical Investigation. 2014 Dec 1;124(12):5424–36.

329. Song X, Sun X, Oh SF, Wu M, Zhang Y, Zheng W, et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut RORγ+ regulatory T cell homeostasis. Nature. 2020 Jan 16;577(7790):410–5.

330. Hang S, Paik D, Yao L, Kim E, Trinath J, Lu J, et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. Nature. 2019 Dec 5;576(7785):143–8.

331. Miyamoto Y, Kikuta J, Matsui T, Hasegawa T, Fujii K, Okuzaki D, et al. Periportal macrophages protect against commensal-driven liver inflammation. Nature. 2024 May 23;629(8013):901–9.

332. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet–Induced Obesity and Diabetes in Mice. Diabetes. 2008 Jun 1;57(6):1470–81.

333. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. Diabetes. 2007 Jul 1;56(7):1761–72.

334. Mazagova M, Wang L, Anfora AT, Wissmueller M, Lesley SA, Miyamoto Y, et al. Commensal microbiota is hepatoprotective and prevents liver fibrosis in mice. The FASEB Journal. 2015 Mar 2;29(3):1043–55.

335. Guarner F, Sanders ME, Szajewska H, Cohen H, Eliakim R, Herrera C, et al. Probiotics and prebiotics. World Gastroenterology Organisation; 2023.

336. Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, et al. Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. Front Microbiol. 2020;11:1662.

337. Dempsey E, Corr SC. Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. Front Immunol. 2022;13:840245.

338. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. Nat Rev Microbiol. 2010 Mar;8(3):171–84.

339. Panpetch W, Phuengmaung P, Cheibchalard T, Somboonna N, Leelahavanichkul A, Tumwasorn S. Lacticaseibacillus casei Strain T21 Attenuates Clostridioides difficile Infection in a Murine Model Through Reduction of Inflammation and Gut Dysbiosis With Decreased Toxin Lethality and Enhanced Mucin Production. Front Microbiol. 2021;12:745299.

340. Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. Clin Exp Immunol. 2008 Mar;151(3):528–35.

341. Terada T, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y. Effects of Probiotics Lactobacillus reuteri and Clostridium butyricum on the Expression of Toll-like Receptors, Pro- and Anti-inflammatory Cytokines, and Antimicrobial Peptides in Broiler Chick Intestine. J Poult Sci. 2020 Oct 25;57(4):310–8.

342. Todorov SD. Bacteriocins from Lactobacillus plantarum - production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. Braz J Microbiol. 2009 Apr;40(2):209–21.

343. Feng Y, Wang Y, Wang P, Huang Y, Wang F. Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. Cellular Physiology and Biochemistry. 2018;49(1):190–205.

344. Arai S, Iwabuchi N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Hachimura S. Orally administered heat-killed Lactobacillus paracasei MCC1849 enhances antigen-specific IgA secretion and induces follicular helper T cells in mice. PLoS One. 2018;13(6):e0199018.

345. Kikuchi Y, Kunitoh-Asari A, Hayakawa K, Imai S, Kasuya K, Abe K, et al. Oral administration of Lactobacillus plantarum strain AYA enhances IgA secretion and provides survival protection against influenza virus infection in mice. PLoS One. 2014;9(1):e86416.

346. Kale-Pradhan PB, Jassaly HK, Wilhelm SM. Role of *Lactobacillus* in the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea: A Meta-analysis. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2010 Feb 6;30(2):119–26.

347. Waldum HL, Kleveland PM, Sørdal ØF. Helicobacter pylori and gastric acid: an intimate and reciprocal relationship. Therap Adv Gastroenterol. 2016 Nov;9(6):836–44.

348. Deguchi R, Nakaminami H, Rimbara E, Noguchi N, Sasatsu M, Suzuki T, et al. Effect of pretreatment with *Lactobacillus gasseri* OLL2716 on first-line *Helicobacter pylori* eradication therapy. J Gastroenterol Hepatol. 2012 May 20;27(5):888–92.

349. Efrati C. *Helicobacter pylori* eradication: Sequential therapy and *Lactobacillus reuteri* supplementation. World J Gastroenterol. 2012;18(43):6250.

350. Suo H, Zhao X, Qian Y, Sun P, Zhu K, Li J, et al. Lactobacillus fermentum Suo Attenuates HCl/Ethanol Induced Gastric Injury in Mice through Its Antioxidant Effects. Nutrients. 2016 Mar 10;8(3):155.

351. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. Therap Adv Gastroenterol. 2013 Jan;6(1):39–51.

352. Peroni DG, Morelli L. Probiotics as Adjuvants in Vaccine Strategy: Is There More Room for Improvement? Vaccines (Basel). 2021 Jul 21;9(8):811.

353. MacDonald TT, Bell I. Probiotics and the immune response to vaccines. Proceedings of the Nutrition Society. 2010 Aug 14;69(3):442–6.

354. Marschan E, Kuitunen M, Kukkonen K, Poussa T, Sarnesto A, Haahtela T, et al. Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation. Clinical & Experimental Allergy. 2008 Apr 11;38(4):611–8.

355. Hart AL. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. Gut. 2004 Nov 1;53(11):1602–9.

356. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina W V., Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005 Feb 22;102(8):2880–5.

357. Karlsson H, Larsson P, Wold AE, Rudin A. Pattern of Cytokine Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Commensal Bacteria Is Profoundly Changed when Monocytes Differentiate into Dendritic Cells. Infect Immun. 2004 May;72(5):2671–8.

358. van Baarlen P, Troost FJ, van Hemert S, van der Meer C, de Vos WM, de Groot PJ, et al. Differential NF-κB pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009 Feb 17;106(7):2371–6.

359. Riehl TE, Alvarado D, Ee X, Zuckerman A, Foster L, Kapoor V, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells. Gut. 2019 Jun;68(6):1003–13.

360. Lee JE, Kye YC, Park SM, Shim BS, Yoo S, Hwang E, et al. Bacillus subtilis spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens. Vet Res. 2020 Dec 24;51(1):68.

361. Chattha KS, Vlasova AN, Kandasamy S, Rajashekara G, Saif LJ. Divergent Immunomodulating Effects of Probiotics on T Cell Responses to Oral Attenuated Human Rotavirus Vaccine and Virulent Human Rotavirus Infection in a Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. The Journal of Immunology. 2013 Sep 1;191(5):2446–56.

362. Zimmermann P, Curtis N. The influence of probiotics on vaccine responses – A systematic review. Vaccine. 2018 Jan;36(2):207–13.

363. Bosch M, Méndez M, Pérez M, Farran A, Fuentes MC, Cuñé J. Lactobacillus plantarum CECT7315 and CECT7316 stimulate immunoglobulin production after influenza vaccination in elderly. Nutr Hosp. 2012;27(2):504–9.

364. Davidson LE, Fiorino AM, Snydman DR, Hibberd PL. Lactobacillus GG as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Eur J Clin Nutr. 2011 Apr 2;65(4):501–7.

365. Cesta MF. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Toxicol Pathol. 2006 Aug 1;34(5):599–608.

366. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity. Nat Rev Immunol. 2004 Sep 1;4(9):699–710.

367. Yan Z, Wang J, Gong S, Huang X. Cell Proliferation in the Endolymphatic Sac In Situ After the Rat Waldeyer Ring Equivalent Immunostimulation. Laryngoscope. 2003 Sep 3;113(9):1609–14.

368. Pabst R. The anatomical basis for the immune function of the gut. Anat Embryol (Berl). 1987 Jun;176(2):135–44.

369. Goodman T, Lefrançois L. Expression of the γ-δ T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. Nature. 1988 Jun;333(6176):855–8.

370. Bonneville M, Janeway CA, Ito K, Haser W, Ishida I, Nakanishit N, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of γδ T cells. Nature. 1988 Dec;336(6198):479–81.

371. Fujihashi K, McGhee JR, Kweon MN, Cooper MD, Tonegawa S, Takahashi I, et al. gamma/delta T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. J Exp Med. 1996 Apr 1;183(4):1929–35.

372. Poussier P, Edouard P, Lee C, Binnie M, Julius M. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. J Exp Med. 1992 Jul 1;176(1):187–99.

373. Hirata I, Berrebi G, Austin LL, Keren DF, Dobbins WO. Immunohistological characterization of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in control ileum and colon and in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 1986 Jun;31(6):593–603.

374. Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Gut. 1971 Dec;12(12):988–94.

375. Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? Immunology. 2004 Sep;113(1):15–22.

376. Lauwers GY, Fasano A, Brown IS. Duodenal lymphocytosis with no or minimal enteropathy: much ado about nothing? Modern Pathology. 2015 Jan;28:S22–9.

377. Bienenstock J, McDermott MR. Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. Immunol Rev. 2005 Aug 28;206(1):22–31.

378. TANGO M, SUZUKI E, GEJYO F, USHIKI T. The Presence of Specialized Epithelial Cells on the Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT) in the Mouse. Arch Histol Cytol. 2000;63(1):81–9.

379. Pabst R, Tschernig T. Perivascular capillaries in the lung: An important but neglected vascular bed in immune reactions? Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002 Aug;110(2):209–14.

380. Randall TD. Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT). In 2010. p. 187–241.

381. Pabst R. Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. Immunol Lett. 2007 Sep;112(1):1–8.

382. Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. Journal of Clinical Investigation. 2006 Dec 1;116(12):3183–94.

383. Kocks JR, Davalos-Misslitz ACM, Hintzen G, Ohl L, Förster R. Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue. J Exp Med. 2007 Apr 16;204(4):723–34.

384. Woodland DL, Randall TD. Anatomical features of anti-viral immunity in the respiratory tract. Semin Immunol. 2004 Jun;16(3):163–70.

385. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, et al. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. J Exp Med. 1997 Jun 16;185(12):2143–56.

386. GeurtsvanKessel CH, Willart MAM, Bergen IM, van Rijt LS, Muskens F, Elewaut D, et al. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. J Exp Med. 2009 Oct 26;206(11):2339–49.

387. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. Nat Med. 2004 Sep 15;10(9):927–34.

388. Xu B, Wagner N, Pham LN, Magno V, Shan Z, Butcher EC, et al. Lymphocyte Homing to

Bronchus-associated Lymphoid Tissue (BALT) Is Mediated by L-selectin/PNAd, α4β1 Integrin/VCAM-1, and LFA-1 Adhesion Pathways. J Exp Med. 2003 May 19;197(10):1255–67.

389. Sato J, Chida K, Suda T, Sato A, Nakamura H. Migratory Patterns of Thoracic Duct Lymphocytes into Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Immunized Rats. Lung. 2000 Sep 1;178(5):295–308.

390. Day TA, Koch M, Nouailles G, Jacobsen M, Kosmiadi GA, Miekley D, et al. Secondary lymphoid organs are dispensable for the development of T-cell-mediated immunity during tuberculosis. Eur J Immunol. 2010 Jun 2;40(6):1663–73.

391. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, Kusser K, Tighe MP, Klonowski KD, et al. Persistence and Responsiveness of Immunologic Memory in the Absence of Secondary Lymphoid Organs. Immunity. 2006 Oct;25(4):643–54.

392. Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. Semin Immunol. 2008 Feb;20(1):26–42.

393. Chen HD, Fraire AE, Joris I, Welsh RM, Selin LK. Specific history of heterologous virus infections determines anti-viral immunity and immunopathology in the lung. Am J Pathol. 2003 Oct;163(4):1341–55.

394. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jörg S, Pradl L, Titukhina M, et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. J Pathol. 2004 Oct 16;204(2):217–28.

395. Marchal-Sommé J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B, et al. Cutting Edge: Nonproliferating Mature Immune Cells Form a Novel Type of Organized Lymphoid Structure in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. The Journal of Immunology. 2006 May 15;176(10):5735–9.

396. Schrama D, thor Straten P, Fischer WH, McLellan AD, Bröcker EB, Reisfeld RA, et al. Targeting of Lymphotoxin-α to the Tumor Elicits an Efficient Immune Response Associated with Induction of Peripheral Lymphoid-like Tissue. Immunity. 2001 Feb;14(2):111–21.

397. Schrama D, Voigt H, Eggert AO, Xiang R, Zhou H, Schumacher TNM, et al. Immunological tumor destruction in a murine melanoma model by targeted LTα independent of secondary lymphoid tissue. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2008 Jan 29;57(1):85–95.

398. Connolly JH. Immunopathological characterisation of infectious diseases of the koala and the platypus [Internet]. University of Sydney; 2000 [cited 2025 Nov 25]. Available from: http://hdl.handle.net/2123/8428

399. He W, Zhang W, Cheng C, Li J, Wu X, Li M, et al. The distributive and structural characteristics of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in Bactrian camels (*Camelus bactrianus*). PeerJ. 2019 Mar 11;7:e6571.

400. Spit BJ, Hendriksen EGJ, Bruijntjes JP, Kuper CF. Nasal lymphoid tissue in the rat. Cell Tissue Res. 1989 Jan;255(1).

401. Asanuma H, Hodson Thompson A, Iwasaki T, Sato Y, Inaba Y, Aizawa C, et al. Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. J Immunol Methods. 1997 Mar;202(2):123–31.

402. Park HS, Francis KP, Yu J, Cleary PP. Membranous Cells in Nasal-Associated Lymphoid Tissue: A Portal of Entry for the Respiratory Mucosal Pathogen Group A Streptococcus. The Journal of Immunology. 2003 Sep 1;171(5):2532–7.

403. Sosa GA, Roux ME. Development of T Lymphocytes in the Nasal-associated Lymphoid Tissue (NALT) from Growing Wistar Rats. J Immunol Res. 2004 Jan;11(1):29–34.

404. Zuercher AW, Cebra JJ. Structural and functional differences between putative mucosal inductive sites of the rat. Eur J Immunol. 2002 Nov;32(11):3191–6.

405. Hiroi T, Iwatani K, Iijima H, Kodama S, Yanagita M, Kiyono H. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. Eur J Immunol. 1998 Oct;28(10):3346–53.

406. Hiroi T, Goto H, Someya K, Yanagita M, Honda M, Yamanaka N, et al. HIV Mucosal Vaccine: Nasal Immunization with rBCG-V3J1 Induces a Long Term V3J1 Peptide-Specific Neutralizing Immunity in Th1- and Th2-Deficient Conditions. The Journal of Immunology. 2001 Nov 15;167(10):5862–7.

407. Yanagita M, Hiroi T, Kitagaki N, Hamada S, Ito HO, Shimauchi H, et al. Nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) immunity: fimbriae-specific Th1 and Th2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. J Immunol. 1999 Mar 15;162(6):3559–65.

408. HERITAGE PL, UNDERDOWN BJ, ARSENAULT AL, SNIDER DP, McDERMOTT MR. Comparison of Murine Nasal-associated Lymphoid Tissue and Peyer's Patches. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Oct 1;156(4):1256–62.

409. Porgador A, Staats HF, Itoh Y, Kelsall BL. Intranasal Immunization with Cytotoxic T-Lymphocyte Epitope Peptide and Mucosal Adjuvant Cholera Toxin: Selective Augmentation of Peptide-Presenting Dendritic Cells in Nasal

Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Infect Immun. 1998 Dec;66(12):5876–81.

410. Csencsits KL, Jutila MA, Pascual DW. Nasal-Associated Lymphoid Tissue: Phenotypic and Functional Evidence for the Primary Role of Peripheral Node Addressin in Naive Lymphocyte Adhesion to High Endothelial Venules in a Mucosal Site. The Journal of Immunology. 1999 Aug 1;163(3):1382–9.

411. HERITAGE, BROOK, UNDERDOWN, McDERMOTT. Intranasal immunization with polymer-grafted microparticles activates the nasal-associated lymphoid tissue and draining lymph nodes. Immunology. 1998 Feb 25;93(2):249–56.

412. Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, Kodama S, Suzuki M, Mogi G, et al. Nasal Immunization Induces *Haemophilus influenzae*– specific Th1 and Th2 Responses with Mucosal IgA and Systemic IgG Antibodies for Protective Immunity. J Infect Dis. 1999 Jul;180(1):122–32.

413. Imaoka K, Miller CJ, Kubota M, McChesney MB, Lohman B, Yamamoto M, et al. Nasal Immunization of Nonhuman Primates with Simian Immunodeficiency Virus p55 *gag* and Cholera Toxin Adjuvant Induces Th1/Th2 Help for Virus-Specific Immune Responses in Reproductive Tissues. The Journal of Immunology. 1998 Dec 1;161(11):5952–8.

414. Park H, Costalonga M, Reinhardt RL, Dombek PE, Jenkins MK, Cleary PP. Primary induction of CD4 T cell responses in nasal associated lymphoid tissue during group A streptococcal infection. Eur J Immunol. 2004 Oct 24;34(10):2843–53.

415. Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Forsthuber T, Lehmann P V, et al. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. J Exp Med. 1996 Apr 1;183(4):1561–7.

416. Hoyne GF, Askonas BA, Hetzel C, Thomas WR, Lamb JR. Regulation of house dust mite responses by intranasally administered peptide: transient activation of CD4 + T cells precedes the development of tolerance *in vivo*. Int Immunol. 1996;8(3):335–42.

417. Wolvers DA, van der Cammen MJ, Kraal G. Mucosal tolerance is associated with, but independent of, up-regulation Th2 responses. Immunology. 1997 Nov;92(3):328–33.

418. Wolvers DA, Coenen-de Roo CJ, Mebius RE, van der Cammen MJ, Tirion F, Miltenburg AM, et al. Intranasally induced immunological tolerance is determined by characteristics of the draining lymph nodes: studies with OVA and human cartilage gp-39. J Immunol. 1999 Feb 15;162(4):1994–8.

419. Tilney NL. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. J Anat. 1971 Sep;109(Pt 3):369–83.

420. Casteleyn C, Broos AMC, Simoens P, Van den Broeck W. NALT (nasal cavity-associated lymphoid tissue) in the rabbit. Vet Immunol Immunopathol. 2010 Feb;133(2–4):212–8.

421. Vintiñi E, Villena J, Alvarez S, Medina M. Administration of a probiotic associated with nasal vaccination with inactivated *Lactococcus lactis* - PppA induces effective protection against pneumoccocal infection in young mice. Clin Exp Immunol. 2010 Jan 15;159(3):351–62.

422. Medina M, Villena J, Salva S, Vintiñi E, Langella P, Alvarez S. Nasal administration of *Lactococcus lactis* improves local and systemic immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. Microbiol Immunol. 2008 Aug 21;52(8):399–409.

423. DEBERTIN AS, TSCHERNIG T, TÖNJES H, KLEEMANN WJ, TRÖGER HD, PABST R. Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. Clin Exp Immunol. 2003 Nov 24;134(3):503–7.

424. Bemark M, Pitcher MJ, Dionisi C, Spencer J. Gut-associated lymphoid tissue: a microbiota-driven hub of B cell immunity. Trends Immunol. 2024 Mar;45(3):211–23.

425. Cornes JS. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. Gut. 1965 Jun 1;6(3):225–9.

426. Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, von Burg N, Riis LB, Spencer J, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. Mucosal Immunol. 2021 Jul;14(4):793–802.

427. Beyaz F, Ergün E, Bayraktaroğlu AG, Ergün L. The identification of intestinal M cells in the sacculus rotundus and appendix of the Angora rabbit. Vet Res Commun. 2010 Mar 9;34(3):255–65.

428. Kanamori Y, Ishimaru K, Nanno M, Maki K, Ikuta K, Nariuchi H, et al. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. J Exp Med. 1996 Oct 1;184(4):1449–59.

429. Baptista AP, Olivier BJ, Goverse G, Greuter M, Knippenberg M, Kusser K, et al. Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. Mucosal Immunol. 2013 May;6(3):511–21.

430. Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, et al. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. Nat Commun. 2014 Apr 10;5(1):3704.

431. Hong JB. Rectal tonsil: A case report and literature review. World J Gastroenterol. 2015;21(8):2563.

432. Pabst O, Herbrand H, Worbs T, Friedrichsen M, Yan S, Hoffmann MW, et al. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. Eur J Immunol. 2005 Jan 16;35(1):98–107.

433. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. Nat Immunol. 2001 Nov;2(11):997–1003.

434. Laky K, Lefrançois L, Lingenheld EG, Ishikawa H, Lewis JM, Olson S, et al. Enterocyte Expression of Interleukin 7 Induces Development of γδ T Cells and Peyer's Patches. J Exp Med. 2000 May 1;191(9):1569–80.

435. Saito H, Kanamori Y, Takemori T, Nariuchi H, Kubota E, Takahashi-Iwanaga H, et al. Generation of Intestinal T Cells from Progenitors Residing in Gut Cryptopatches. Science (1979). 1998 Apr 10;280(5361):275–8.

436. Eberl G, Littman DR. Thymic Origin of Intestinal αß T Cells Revealed by Fate Mapping of RORγt + Cells. Science (1979). 2004 Jul 9;305(5681):248–51.

437. Lambolez F, Arcangeli ML, Joret AM, Pasqualetto V, Cordier C, Santo JP Di, et al. The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. Nat Immunol. 2006 Jan 11;7(1):76–82.

438. Langman JM, Rowland R. The number and distribution of lymphoid follicles in the human large intestine. J Anat. 1986 Dec;149:189–94.

439. Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, Hobeika E, Finke D, Esser C, et al. Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles. Science (1979). 2011 Dec 16;334(6062):1561–5.

440. Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. Nature. 2008 Nov 5;456(7221):507–10.

441. Donaldson DS, Bradford BM, Artis D, Mabbott NA. Reciprocal regulation of lymphoid tissue development in the large intestine by IL-25 and IL-23. Mucosal Immunol. 2015 May;8(3):582–95.

442. Zaph C, Du Y, Saenz SA, Nair MG, Perrigoue JG, Taylor BC, et al. Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. J Exp Med. 2008 Sep 29;205(10):2191–8.

443. Senda T, Dogra P, Granot T, Furuhashi K, Snyder ME, Carpenter DJ, et al. Microanatomical dissection of human intestinal T-cell immunity reveals site-specific changes in gut-associated lymphoid tissues over life. Mucosal Immunol. 2019 Mar;12(2):378–89.

444. Fenton TM, Jørgensen PB, Niss K, Rubin SJS, Mörbe UM, Riis LB, et al. Immune Profiling of Human Gut-Associated Lymphoid Tissue Identifies a Role for Isolated Lymphoid Follicles in Priming of Region-Specific Immunity. Immunity. 2020 Mar;52(3):557-570.e6.

445. Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, et al. Identification of Multiple Isolated Lymphoid Follicles on the Antimesenteric Wall of the Mouse Small Intestine. The Journal of Immunology. 2002 Jan 1;168(1):57–64.

446. De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, et al. Abnormal Development of Peripheral Lymphoid Organs in Mice Deficient in Lymphotoxin. Science (1979). 1994 Apr 29;264(5159):703–7.

447. Sorenson RL, Brelje TC. Histology Guide. 2025 [cited 2025 Sep 24]. Gastrointestinal Tract. Available from: https://histologyguide.com/gallery/14-gastrointestinal-tract.html

448. Van Kruiningen HJ, West AB, Freda BJ, Holmes KA. Distribution of Peyer's Patches in the Distal Ileum. Inflamm Bowel Dis. 2002 May;8(3):180–5.

449. Spencer J, MacDonald TT, Finn T, Isaacson PG. The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. Clin Exp Immunol. 1986 Jun;64(3):536–43.

450. Adachi S. Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo. Int Immunol. 1997 Apr 1;9(4):507–14.

451. Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. Int J Inflam. 2010;2010:1–12.

452. Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen F, Morton HC, Norderhaug IN, Yamanaka T, et al. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. Immunol Rev. 1999 Oct 28;171(1):45–87.

453. Farstad IN, Halstensen TS, Kvale D, Fausa O, Brandtzaeg P. Topographic distribution of homing receptors on B and T cells in human gut-associated lymphoid tissue: relation of L-selectin and integrin alpha 4 beta 7 to naive and memory phenotypes. Am J Pathol. 1997 Jan;150(1):187–99.

454. Streeter PR, Berg EL, Rouse BTN, Bargatze RF, Butcher EC. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. Nature. 1988 Jan;331(6151):41–6.

455. Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural

study of intestinal lymphoid follicles. Gastroenterology. 1974 Feb;66(2):189–203.

456. Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. Trends Microbiol. 1996 Jan;4(1):22–9.

457. Corr SC, Gahan CCGM, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Jan;52(1):2–12.

458. des Rieux A, Fievez V, Théate I, Mast J, Préat V, Schneider YJ. An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007 Apr;30(5):380–91.

459. Kernéis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into M Cells that Transport Bacteria. Science (1979). 1997 Aug 15;277(5328):949–52.

460. Jensen VB, Harty JT, Jones BD. Interactions of the Invasive Pathogens *Salmonella typhimurium* , *Listeria monocytogenes* , and *Shigella flexneri* with M Cells and Murine Peyer's Patches. Infect Immun. 1998 Aug;66(8):3758–66.

461. Barone F, Patel P, Sanderson J, Spencer J. Gut-associated lymphoid tissue contains the molecular machinery to support T-cell-dependent and T-cell-independent class switch recombination. Mucosal Immunol. 2009 Nov;2(6):495–503.

462. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. J Exp Med. 2000 Apr 17;191(8):1381–94.

463. Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. J Exp Med. 1996 Jan 1;183(1):237–47.

464. Spencer J, Finn T, Isaacson PG. Human Peyer's patches: an immunohistochemical study. Gut. 1986 Apr 1;27(4):405–10.

465. Bonnardel J, Da Silva C, Henri S, Tamoutounour S, Chasson L, Montañana-Sanchis F, et al. Innate and Adaptive Immune Functions of Peyer's Patch Monocyte-Derived Cells. Cell Rep. 2015 May;11(5):770–84.

466. Lelouard H, Henri S, De Bovis B, Mugnier B, Chollat–Namy A, Malissen B, et al. Pathogenic Bacteria and Dead Cells Are Internalized by a Unique Subset of Peyer's Patch Dendritic Cells That Express Lysozyme. Gastroenterology. 2010 Jan;138(1):173-184.e3.

467. Contractor N, Louten J, Kim L, Biron CA, Kelsall BL. Cutting Edge: Peyer's Patch Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) Produce Low Levels of Type I Interferons: Possible Role for IL-10, TGFβ, and Prostaglandin E2 in Conditioning a Unique Mucosal pDC Phenotype. The Journal of Immunology. 2007 Sep 1;179(5):2690–4.

468. Iwasaki A, Kelsall BL. Unique Functions of CD11b+, CD8α+, and Double-Negative Peyer's Patch Dendritic Cells. The Journal of Immunology. 2001 Apr 15;166(8):4884–90.

469. Lelouard H, Fallet M, de Bovis B, Méresse S, Gorvel J. Peyer's Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores. Gastroenterology. 2012 Mar;142(3):592-601.e3.

470. Reboldi A, Arnon TI, Rodda LB, Atakilit A, Sheppard D, Cyster JG. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. Science. 2016 May 13;352(6287):aaf4822.

471. Yamanaka T, Straumfors A, Morton HC, Fausa O, Brandtzaeg P, Farstad IN. M cell pockets of human Peyer's patches are specialized extensions of germinal centers. Eur J Immunol. 2001 Jan;31(1):107–17.

472. Spencer J, Sollid LM. The human intestinal B-cell response. Mucosal Immunol. 2016 Sep;9(5):1113–24.

473. Zhao Y, Uduman M, Siu JHY, Tull TJ, Sanderson JD, Wu YCB, et al. Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. Nat Commun. 2018 Sep 21;9(1):3857.

474. Senda T, Dogra P, Granot T, Furuhashi K, Snyder ME, Carpenter DJ, et al. Microanatomical dissection of human intestinal T-cell immunity reveals site-specific changes in gut-associated lymphoid tissues over life. Mucosal Immunol. 2019 Mar;12(2):378–89.

475. King D. Histology at SIU. 2022 [cited 2025 Nov 24]. Ileum, Peyer's Patch. Available from: https://histology.siu.edu/erg/GI196b.htm

476. Karunaharamoorthy A, Mytilinaios D. Kenhub. 2023 [cited 2025 Aug 28]. Cecum and vermiform appendix. Available from: https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/cecum-and-vermiform-appendix

477. Swidsinski A. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence *in situ* hybridization study in mice. World J Gastroenterol. 2005;11(8):1131.

478. Palestrant D, Holzknecht ZE, Collins BH, Parker W, Miller SE, Bollinger RR. Microbial Biofilms in the Gut: Visualization by Electron Microscopy and by Acridine Orange Staining. Ultrastruct Pathol. 2004 Jan 10;28(1):23–7.

479. Randal Bollinger R, Barbas AS, Bush EL, Lin SS, Parker W. Biofilms in the large bowel suggest an apparent function of the human vermiform appendix. J Theor Biol. 2007 Dec;249(4):826–31.

480. Im GY, Modayil RJ, Lin CT, Geier SJ, Katz DS, Feuerman M, et al. The Appendix May Protect Against Clostridium difficile Recurrence. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2011 Dec;9(12):1072–7.

481. Na X, Kelly C. The Vermiform Appendix and Recurrent Clostridium difficile Infection: A Curious Connection. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2011 Dec;9(12):1017–9.

482. Bockman DE, Cooper MD. Early lymphoepithelial relationships in human appendix. A combined light- and electron-microscopic study. Gastroenterology. 1975 May;68(5 Pt 1):1160–8.

483. Deniz K, Sökmensüer LK, Sökmensüer C, Patıroğlu TE. Significance of intraepithelial lymphocytes in appendix. Pathol Res Pract. 2007 Oct;203(10):731–5.

484. Corr SC, Gahan CCGM, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Jan;52(1):2–12.

485. Uchida J. Electron microscopic study of microfold cells (M cells) in normal and inflamed human appendix. Gastroenterol Jpn. 1988 Jun;23(3):251–62.

486. Spencer J, Finn T, Isaacson PG. Gut associated lymphoid tissue: a morphological and immunocytochemical study of the human appendix. Gut. 1985 Jul 1;26(7):672–9.

487. Steiniger B, Timphus E, Jacob R, Barth PJ. CD27 + B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. Immunology. 2005 Dec 28;116(4):429–42.

488. Ishimoto Y, Tomiyama-Miyaji C, Watanabe H, Yokoyama H, Ebe K, Tsubata S, et al. Age-dependent variation in the proportion and number of intestinal lymphocyte subsets, especially natural killer T cells, double-positive CD4 + CD8 + cells and B220 + T cells, in mice. Immunology. 2004 Nov 8;113(3):371–7.

489. Hashizume T, Togawa A, Nochi T, Igarashi O, Kweon MN, Kiyono H, et al. Peyer's Patches Are Required for Intestinal Immunoglobulin A Responses to *Salmonella* spp. Infect Immun. 2008 Mar;76(3):927–34.

490. Martinoli C, Chiavelli A, Rescigno M. Entry Route of Salmonella typhimurium Directs the Type of Induced Immune Response. Immunity. 2007 Dec;27(6):975–84.

491. Nagai S, Mimuro H, Yamada T, Baba Y, Moro K, Nochi T, et al. Role of Peyer's patches in the induction of *Helicobacter pylori* -induced gastritis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 May 22;104(21):8971–6.

492. Neutra MR. Interactions of Viruses and Microparticles with Apical Plasma Membranes of M Cells: Implications for Human Immunodeficiency Virus Transmission. J Infect Dis. 1999 May;179(s3):S441–3.

493. Fitzhenry RJ, Reece S, Trabulsi LR, Heuschkel R, Murch S, Thomson M, et al. Tissue Tropism of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Belonging to the O55 Serogroup. Infect Immun. 2002 Aug;70(8):4362–8.

494. Phillips AD. Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. Gut. 2000 Sep 1;47(3):377–81.

495. Grutzkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other enteroinvasive bacteria. Gut. 1990 Sep 1;31(9):1011–5.

496. Hanski C, Kutschka U, Schmoranzer HP, Naumann M, Stallmach A, Hahn H, et al. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of Yersinia enterocolitica serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. Infect Immun. 1989 Mar;57(3):673–8.

497. Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Preferential interaction of Salmonella typhimurium with mouse Peyer's patch M cells. Res Microbiol. 1994;145(7):543–52.

498. Jones BD, Ghori N, Falkow S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. J Exp Med. 1994 Jul 1;180(1):15–23.

499. Fotopoulos G, Harari A, Michetti P, Trono D, Pantaleo G, Kraehenbuhl JP. Transepithelial transport of HIV-1 by M cells is receptor-mediated. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002 Jul 9;99(14):9410–4.

500. Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 1999 Aug;117(2):359–67.

501. Cavarelli M, Scarlatti G. <scp>HIV</scp> -1 Infection: The Role of the Gastrointestinal Tract. American Journal of Reproductive Immunology. 2014 Jun 2;71(6):537–42.

502. Schneider T, Jahn HU, Schmidt W, Riecken EO, Zeitz M, Ullrich R. Loss of CD4 T lymphocytes in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 is more pronounced in the duodenal mucosa than in the peripheral blood. Berlin

Diarrhea/Wasting Syndrome Study Group. Gut. 1995 Oct 1;37(4):524–9.

503. Li L, Meng G, Graham MF, Shaw GM, Smith PD. Intestinal macrophages display reduced permissiveness to human immunodeficiency virus 1 and decreased surface CCR5. Gastroenterology. 1999 May;116(5):1043–53.

504. Shen R, Meng G, Ochsenbauer C, Clapham PR, Grams J, Novak L, et al. Stromal Down-Regulation of Macrophage CD4/CCR5 Expression and NF-κB Activation Mediates HIV-1 Non-Permissiveness in Intestinal Macrophages. PLoS Pathog. 2011 May 26;7(5):e1002060.

505. Preza GC, Tanner K, Elliott J, Yang OO, Anton PA, Ochoa MT. Antigen-Presenting Cell Candidates for HIV-1 Transmission in Human Distal Colonic Mucosa Defined by CD207 Dendritic Cells and CD209 Macrophages. AIDS Res Hum Retroviruses. 2014 Mar;30(3):241–9.

506. Rhodes JW, Botting RA, Bertram KM, Vine EE, Rana H, Baharlou H, et al. Human anogenital monocyte-derived dendritic cells and langerin+cDC2 are major HIV target cells. Nat Commun. 2021 Apr 12;12(1):2147.

507. Thompson CG, Gay CL, Kashuba ADM. HIV Persistence in Gut-Associated Lymphoid Tissues: Pharmacological Challenges and Opportunities. AIDS Res Hum Retroviruses. 2017 Jun;33(6):513–23.

508. Kiviat NB, Critchlow CW, Hawes SE, Kuypers J, Surawicz C, Goldbaum G, et al. Determinants of Human Immunodeficiency Virus DNA and RNA Shedding in the Anal-Rectal Canal of Homosexual Men. J Infect Dis. 1998 Mar;177(3):571–8.

509. Kelley CF, Haaland RE, Patel P, Evans-Strickfaden T, Farshy C, Hanson D, et al. HIV-1 RNA Rectal Shedding Is Reduced in Men With Low Plasma HIV-1 RNA Viral Loads and Is Not Enhanced by Sexually Transmitted Bacterial Infections of the Rectum. J Infect Dis. 2011 Sep 1;204(5):761–7.

510. Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, et al. Viral Suppression and Immune Restoration in the Gastrointestinal Mucosa of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Initiating Therapy during Primary or Chronic Infection. J Virol. 2006 Aug 15;80(16):8236–47.

511. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4 + T-Cell Depletion in Gut Lymphoid Tissue during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Substantial Delay in Restoration following Highly Active Antiretroviral Therapy. J Virol. 2003 Nov;77(21):11708–17.

512. Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. Curr Opin HIV AIDS. 2008 May;3(3):356–61.

513. Sankaran S, Guadalupe M, Reay E, George MD, Flamm J, Prindiville T, et al. Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005 Jul 12;102(28):9860–5.

514. Cummins AG, LaBrooy JT, Stanley DP, Rowland R, Shearman DJ. Quantitative histological study of enteropathy associated with HIV infection. Gut. 1990 Mar 1;31(3):317–21.

515. Batman PA, Kotler DP, Kapembwa MS, Booth D, Potten CS, Orenstein JM, et al. HIV enteropathy: crypt stem and transit cell hyperproliferation induces villous atrophy in HIV/Microsporidia-infected jejunal mucosa. AIDS. 2007 Feb 19;21(4):433–9.

516. Batman PA, Miller AR, Forster SM, Harris JR, Pinching AJ, Griffin GE. Jejunal enteropathy associated with human immunodeficiency virus infection: quantitative histology. J Clin Pathol. 1989 Mar;42(3):275–81.

517. Heise C, Miller CJ, Lackner A, Dandekar S. Primary Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection of Intestinal Lymphoid Tissue Is Associated with Gastrointestinal Dysfunction. Journal of Infectious Diseases. 1994 May 1;169(5):1116–20.

518. Zhu Q, Berzofsky JA. Oral vaccines. Gut Microbes. 2013 May 27;4(3):246–52.

519. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. Nat Rev Immunol. 2012 Aug 25;12(8):592–605.

520. Quiding M, Nordström I, Kilander A, Andersson G, Hanson LA, Holmgren J, et al. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. Journal of Clinical Investigation. 1991 Jul 1;88(1):143–8.

521. Simon JK, Maciel M, Weld ED, Wahid R, Pasetti MF, Picking WL, et al. Antigen-specific IgA B memory cell responses to Shigella antigens elicited in volunteers immunized with live attenuated Shigella flexneri 2a oral vaccine candidates. Clinical Immunology. 2011 May;139(2):185–92.

522. Rudenko L, van den Bosch H, Kiseleva I, Mironov A, Naikhin A, Larionova N, et al. Live attenuated pandemic influenza vaccine: Clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries. Vaccine. 2011 Jul;29:A40–4.

523. Bergqvist P, Stensson A, Hazanov L, Holmberg A, Mattsson J, Mehr R, et al. Re-utilization of germinal centers in multiple Peyer's patches results in highly synchronized, oligoclonal, and

affinity-matured gut IgA responses. Mucosal Immunol. 2013 Jan;6(1):122–35.

524. Du MQ, Isaccson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. Lancet Oncol. 2002 Feb;3(2):97–104.

525. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al. Helicobacter pylori Infection and Gastric Lymphoma. New England Journal of Medicine. 1994 May 5;330(18):1267–71.

526. Bautista-Quach MA, Ake CD, Chen M, Wang J. Gastrointestinal lymphomas: Morphology, immunophenotype and molecular features. J Gastrointest Oncol. 2012 Sep;3(3):209–25.

527. Arambula A, Brown JR, Neff L. Anatomy and physiology of the palatine tonsils, adenoids, and lingual tonsils. World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg. 2021 Jul;7(3):155–60.

528. Nave H, Gebert A, Pabst R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. Anat Embryol (Berl). 2001 Nov 1;204(5):367–73.

529. Dwivedi B, Aryal S. Microbe Notes. 2022 [cited 2025 Nov 27]. ELISA- Definition, Principle, Procedure, Types, Steps, Uses. Available from: https://microbenotes.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/

530. Jamalkandi SA, Ahmadi A, Ahrari I, Salimian J, Karimi M, Ghanei M. Oral and nasal probiotic administration for the prevention and alleviation of allergic diseases, asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nutr Res Rev. 2021 Jun 13;34(1):1–16.

531. Pellaton C, Nutten S, Thierry AC, Boudousquié C, Barbier N, Blanchard C, et al. Intragastric and Intranasal Administration of Lactobacillus paracasei NCC2461 Modulates Allergic Airway Inflammation in Mice. Int J Inflam. 2012;2012:686739.

532. Yang WT, Yang GL, Shi SH, Liu YY, Huang HB, Jiang YL, et al. Protection of chickens against H9N2 avian influenza virus challenge with recombinant Lactobacillus plantarum expressing conserved antigens. Appl Microbiol Biotechnol. 2017 Jun 29;101(11):4593–603.

533. Zhang FY, Yang CY, Huang CH, Wang IJ. Exploring the influence of probiotic administration routes on immune responses in atopic march. Front Immunol. 2025;16:1601596.

534. Schenck LP, McGrath JJC, Lamarche D, Stämpfli MR, Bowdish DME, Surette MG. Nasal Tissue Extraction Is Essential for Characterization of the Murine Upper Respiratory Tract Microbiota. mSphere. 2020 Dec 23;5(6).

535. Alvites RD, Caseiro AR, Pedrosa SS, Branquinho ME, Varejão ASP, Maurício AC. The Nasal Cavity of the Rat and Mouse—Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. Anat Rec. 2018 Oct 2;301(10):1678–89.

536. Shashikanth N, Yeruva S, Ong MaLDM, Odenwald MA, Pavlyuk R, Turner JR. Epithelial Organization: The Gut and Beyond. In: Comprehensive Physiology. Wiley; 2017. p. 1497–518.

POSTFAZIONE

I più sentiti ringraziamenti vanno al Relatore, il Prof. Ignazio Castagliuolo, per avermi dato l'opportunità di partecipare a questo studio e per essere sempre stato disponibile. Ringrazio inoltre vivamente la Co-relatrice, la Prof.ssa Paola Brun, per aver supervisionato ogni parte del presente lavoro, sia sul piano sperimentale sia dal punto di vista della stesura dell'elaborato. Le sue direttive, sempre acute e puntuali, si sono rivelate fondamentali per la realizzazione dell'elaborato di Tesi. Seppur nell'impossibilità di menzionare i loro nomi, desidero esprimere profonda riconoscenza anche verso tutte le altre persone coinvolte in questo studio. Non dimenticherò mai la cordialità con cui loro mi hanno accolto nei laboratori, guidandomi inoltre con pazienza attraverso operazioni tecniche le quali, per me, erano del tutto nuove e inesplorate.

Ricordo molto bene l'estate del 2020. Fu un'estate molto particolare per l'Italia: nel marzo precedente, l'emergenza sanitaria legata alla pandemia di Sars-CoV-2 aveva portato a pesanti, ma irrinunciabili, restrizioni alla mobilità delle persone, nel cosiddetto primo *lockdown*. Tuttavia, nel periodo tra la primavera e l'estate avevamo potuto assistere ad un allentamento delle restrizioni. Era come se l'Italia avesse iniziato, anche se solo temporaneamente, a risorgere. Per me l'estate del 2020, nonostante la drammatica situazione che il mondo si trovava ad affrontare, rappresentò una pausa: dopo la sessione di esami, mi concessi un periodo di riposo in cui intrapresi alcuni viaggi e continuai a coltivare i miei interessi. Eppure altrove, nello stesso tempo, gli animi non avrebbero assolutamente potuto essere gli stessi. Invero, proprio sul declinare dell'estate del 2020 si spegneva, presso l'Istituto dei Tumori di Milano, lo storico dell'arte Philippe Daverio. Per una peculiare coincidenza, la sua scomparsa avveniva peraltro approssimativamente a distanza di un anno dall'inizio della mia avventura universitaria. Nel corso degli ultimi anni Daverio è stato sovente presente nei miei pensieri. Ed è proprio al suo stile espositivo, così chiaro, preciso, sagace, tagliente, sempre obiettivo e talora tranciante, che ho cercato di rifarmi per la stesura del presente elaborato. Con le sue tecniche di comunicazione, Daverio riusciva a divulgare argomenti assai complessi facendoli arrivare candidamente ad un pubblico di non addetti ai lavori. Seppur conscio di non poter nemmeno avvicinarmi ai suoi livelli, desidero dedicare a lui questo intero elaborato. Daverio rappresenta per me anche un eccellente esempio di resilienza e di instancabile dedizione al proprio lavoro. Basti pensare che nel luglio 2020, poco prima della sua dipartita, aveva pubblicato la sua ultima opera, e che nei suoi ultimi mesi aveva comunque ultimato altri lavori, usciti postumi nel corso dell'anno successivo.