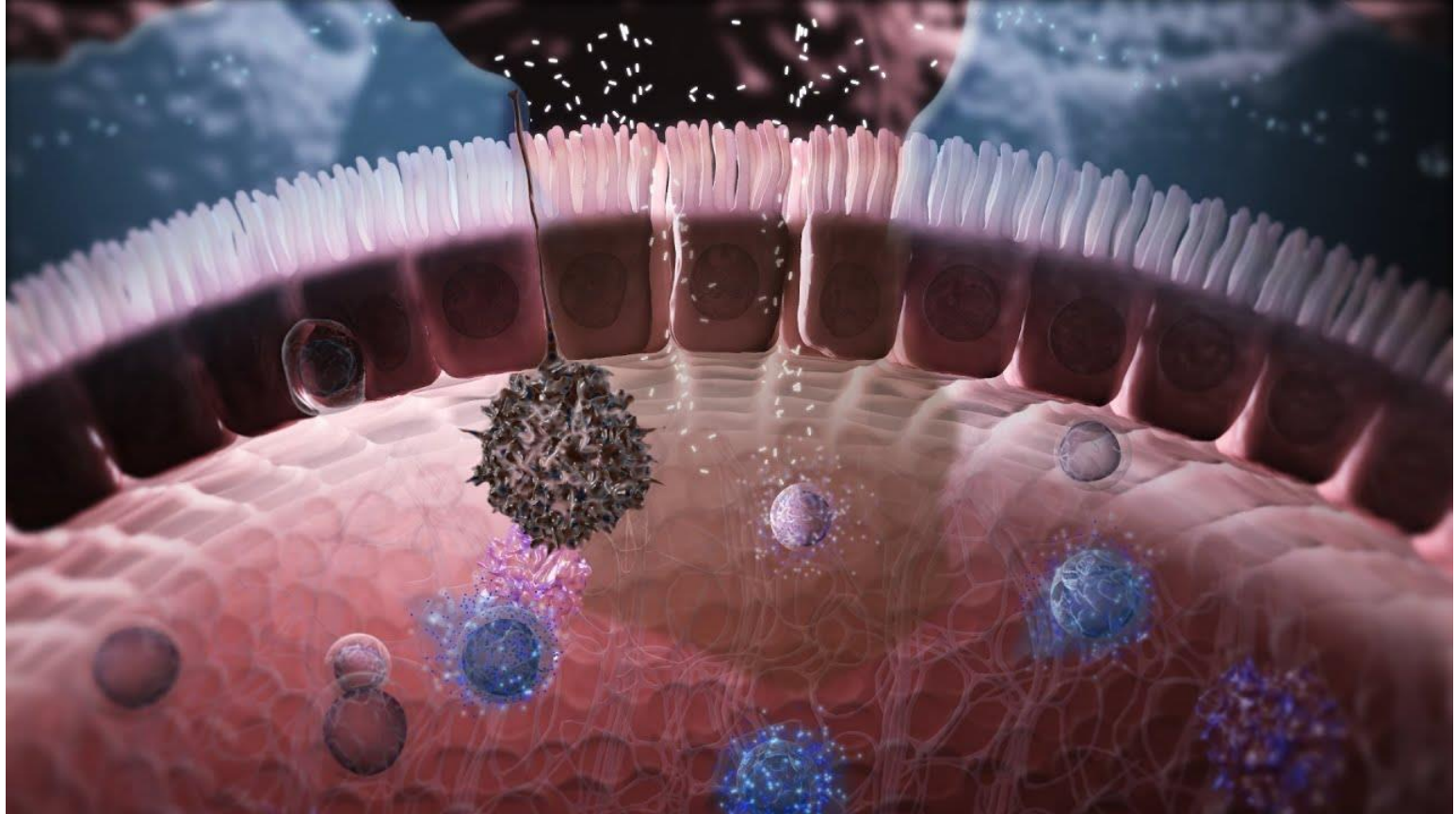
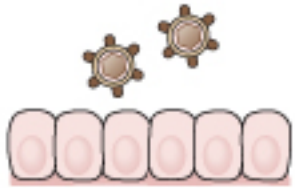


Le barriere epiteliali fisiche, chimiche e microbiologiche





Barriere anatomiche:

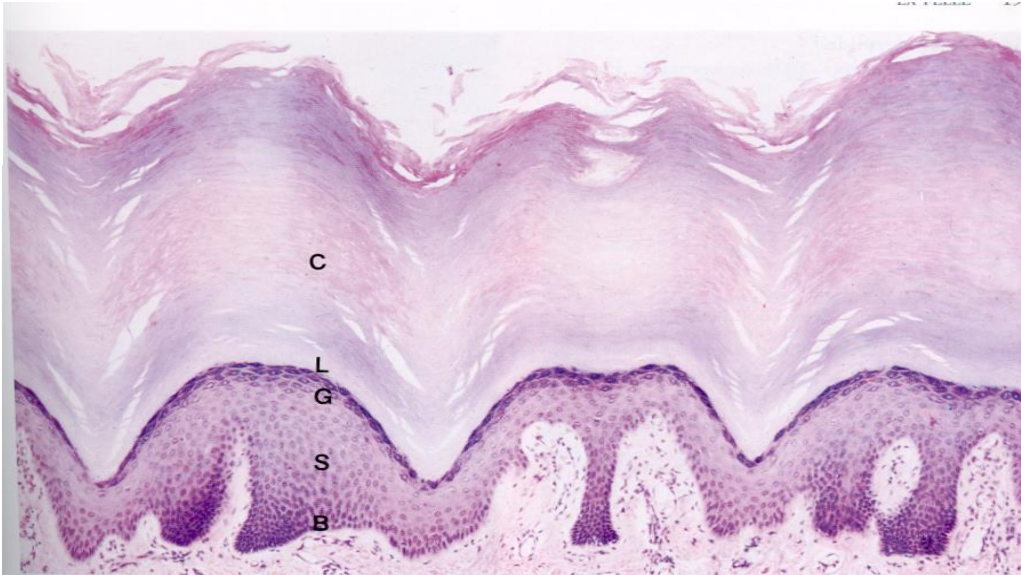


Fig. 9.2 Epidermide (cuscinetto digitale)
(EE × 104)

Questa sezione di pelle piuttosto spessa, presa dallo stesso preparato della Figura 9.1, mostra le caratteristiche generali dell'epidermide. Le cellule prodotte dalle mitosi, che hanno luogo nello strato germinale adiacente al derma, vanno incontro a modificazioni correlate con la produzione di cheratina. Lo strato più esterno cheratinizzato desquama e viene rimpiazzato dal movimento e dalla maturazione progressiva delle cellule dello strato germinativo. La frequenza delle mitosi nello strato germinativo è uguale alla velocità di desquamazione della cheratina dello strato esterno; il processo di maturazione di una cellula basale fino alla desquamazione richiede circa 27 giorni, nell'uomo.

Le fasi di questo processo dinamico sono rappresentate nei cinque strati morfologici:

1. Lo strato germinativo o strato basale B è lo strato

germinativo dell'epidermide. Talvolta è anche denominato strato malpighiano.

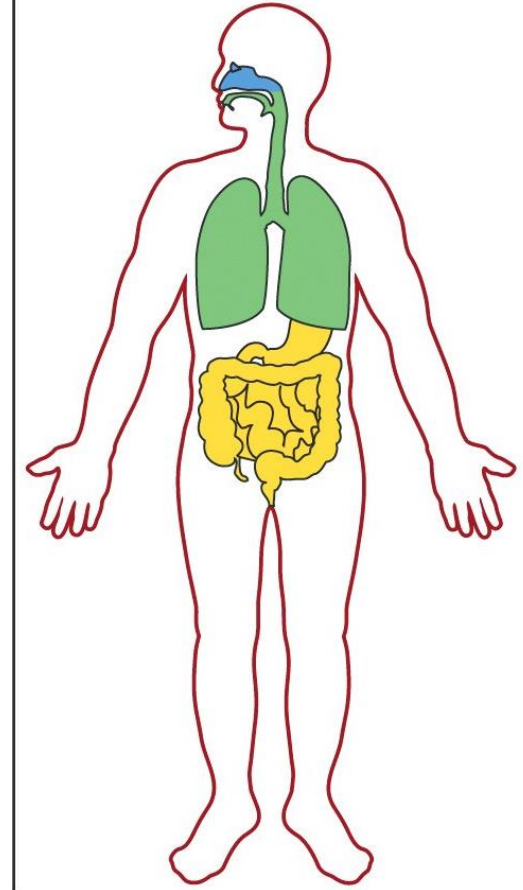
2. Lo strato spinoso o strato delle cellule spinose S, così denominato per l'aspetto spinoso delle cellule ad alto ingrandimento (vedi Figura 9.4); esso contiene cellule in crescita, che iniziano a sintetizzare cheratina.

3. Lo strato granuloso o strato dei granuli G è caratterizzato dalla presenza, all'interno delle cellule, di granuli che contribuiscono al processo di cheratinizzazione.

4. Lo strato lucido L è presente solamente nella pelle molto spessa, e appare come uno strato omogeneo tra lo strato granuloso e quello cheratinizzato.

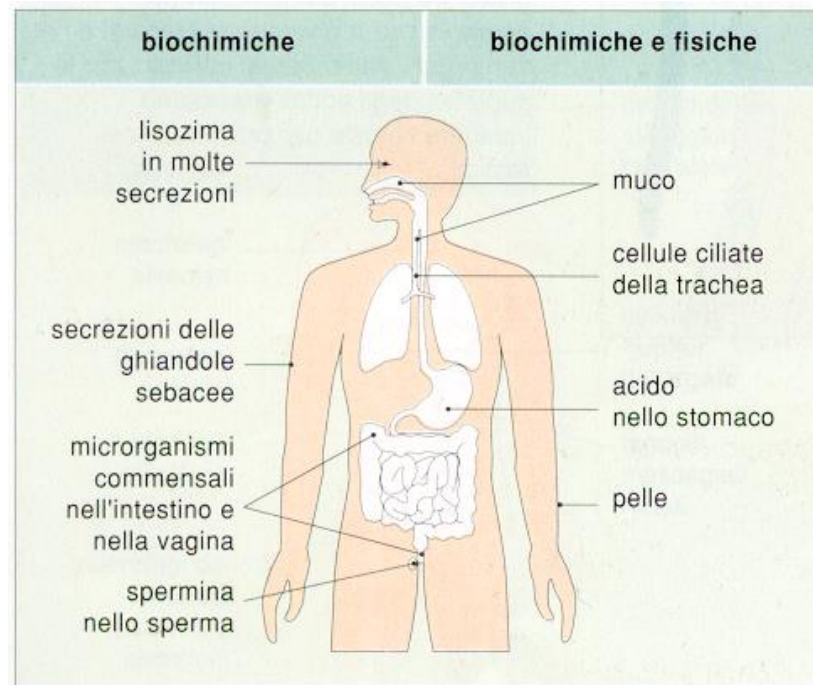
5. Lo strato corneo o strato corneificato C è formato da resti di cellule, appiattiti, fusi, composti principalmente dalla proteina fibrosa cheratina.

Intrinsic epithelial barriers to infection



Membrane mucose

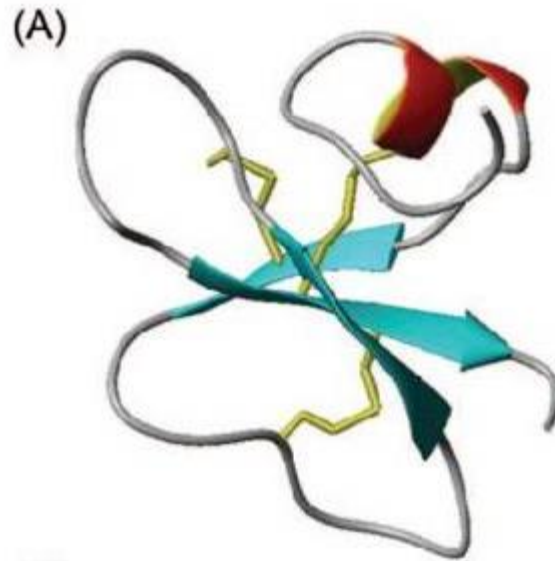
- Apparato digerente
- Apparato respiratorio
- Apparato urogenitale



Barriere epiteliali intrinseche contro le infezioni

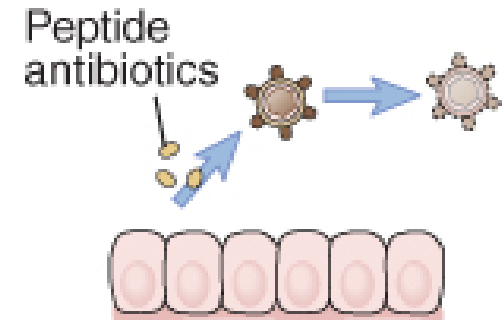
Meccaniche	<p>Cellule epiteliali unite dalle "giunzioni strette"</p> <p>Flusso longitudinale di aria o liquido alle superfici dell'epitelio</p> <p>Movimento del muco mediante le ciglia</p>
Chimiche	<p>Acidi grassi (pelle)</p> <p>Enzimi: lisozima (saliva, sudore, lacrime), pepsina (tratto digerente)</p> <p>Basso pH (stomaco)</p> <p>Peptidi antibatterici; defensine (pelle, tratto digerente), criptidine (intestino)</p>
Microbiologiche	<p>La flora normale compete per i nutrienti e per l'attacco all'epitelio e può produrre sostanze antibatteriche</p>

Defensine



- Peptidi ricchi di cisteina costituiti da 29-34 aa con 3 ponti disolfuro intracatena.
- A seconda della posizione di questi ponti disolfuro e pertanto in base all'omologia della loro sequenza aa e alla struttura tridimensionale si possono distinguere
 - **α -defensine, β -defensine, ϕ -defensine**

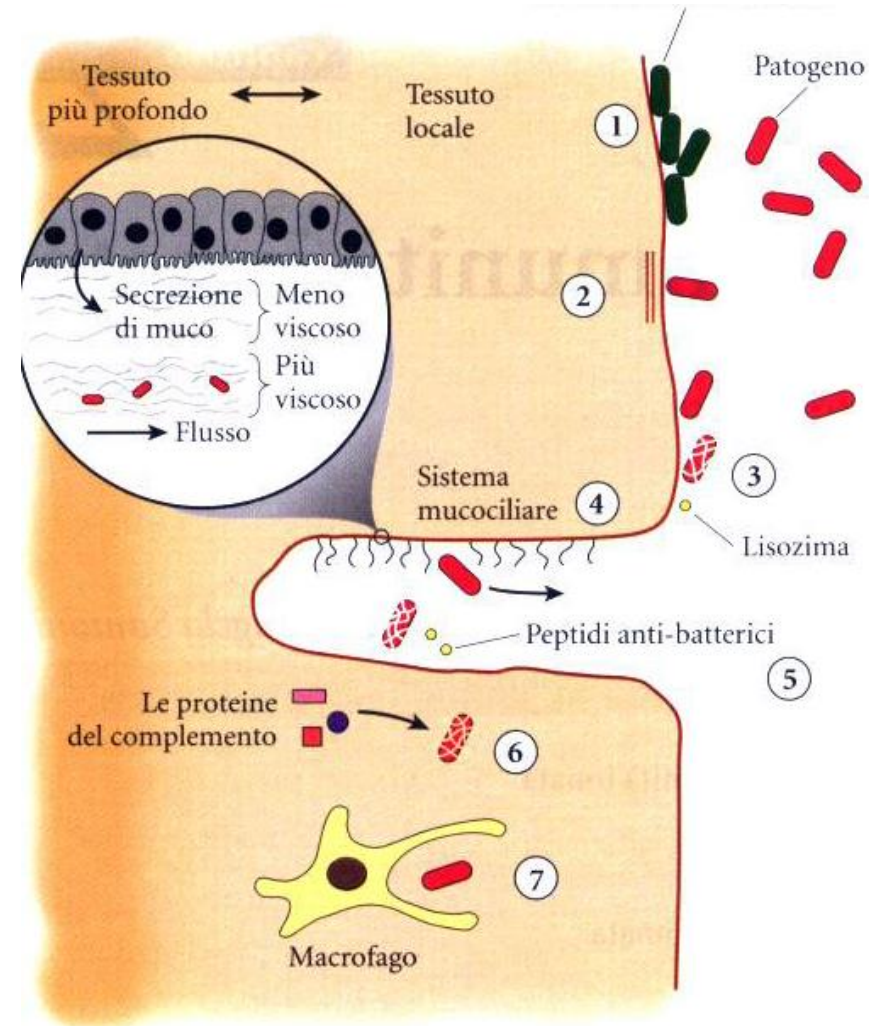
Defensine



- Antibiotici ad ampio spettro
- Capaci di inserirsi nel doppio strato di fosfolipidi alterando l'equilibrio osmotico del microorganismo e portandolo a morte.
- Virus dotati di mantello, batteri Gram-, ma esistono anche peptidi capaci di agire su peptidoglicano dei Gram+

Defensine

- Prodotte dalle cellule epiteliali delle mucose e dai leucociti
- TNF e IL-1 aumentano la sintesi
- Sono sintetizzate come precursori inattivi contenenti una sequenza peptidica che inattiva la funzione proteolitica. L'attivazione avviene ad opera di una proteasi che taglia questa sequenza

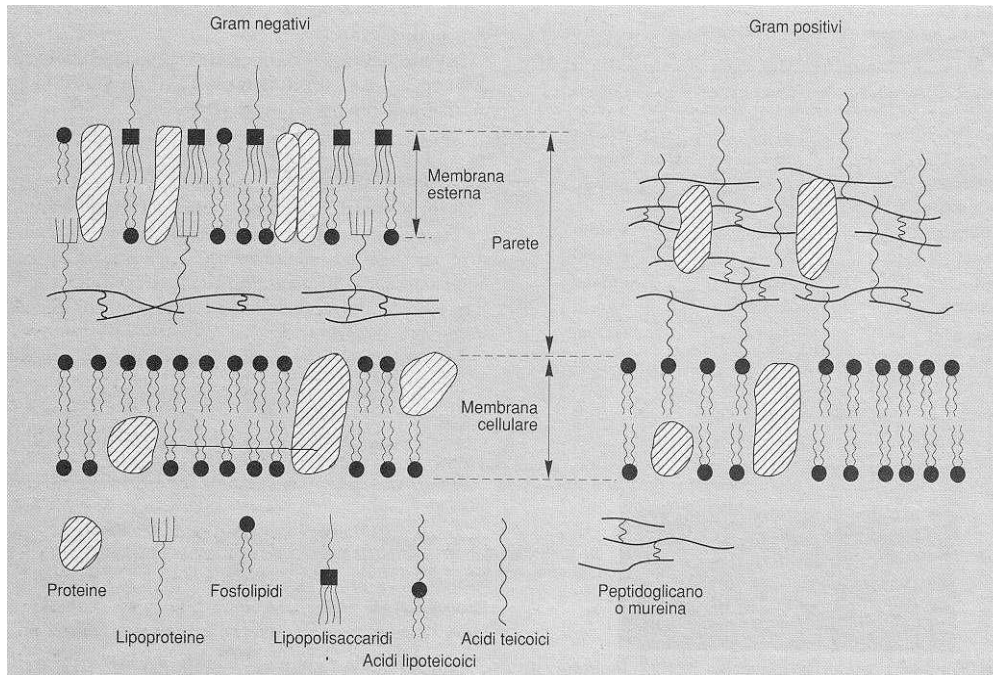


Cellule di Paneth
criptidine

LISOZIMA

- Il lisozima è un enzima presente in tessuti animali dotato di attività battericida.
- È abbondantemente presente in numerose secrezioni animali e umane come le lacrime e nella saliva. Si trova in concentrazioni elevate anche nell'albume d'uovo.
- Il lisozima, legandosi alla superficie batterica, ne riduce la carica elettrica negativa superficiale, rendendo più facile la fagocitosi del batterio

Rappresentazione schematica della parete dei batteri Gram positivi e negativi



- L'enzima agisce attaccando i **peptidoglicani**, che costituiscono la membrana esterna del batterio, e idrolizzando il legame che connette l'acido **N-acetilmuramico** col quarto atomo di carbonio dell'**N-acetilglucosamina**.

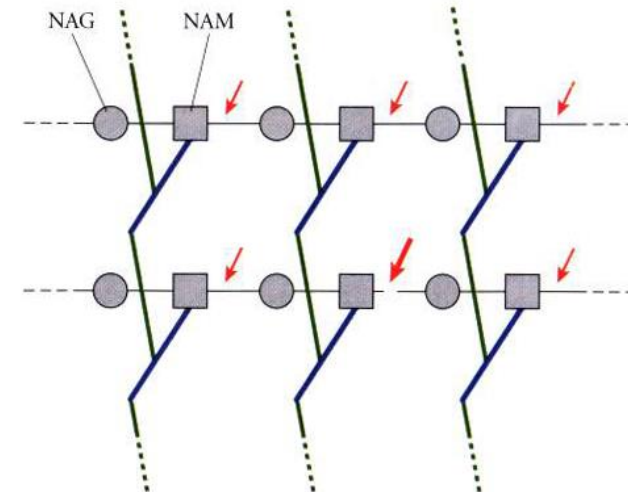


Figura 2.3 Disegno schematico del peptidoglicano della parete cellulare dei batteri. Le linee orizzontali rappresentano l'alternarsi di molecole di N-acetilglucosammina (NAG) (cerchi) e di acido N-acetilmuramico (NAM) (quadrati). Le linee blu e verdi rappresentano i ponti peptidici che uniscono i copolimeri NAG-NAM in una matrice tridimensionale. Le frecce rosse rappresentano i potenziali siti bersaglio del clivaggio del peptidoglicano ad opera del lisozima. Le frecce rosse più marcate mostrano dove il lisozima ha clivato la struttura del copolimero NAG-NAM.

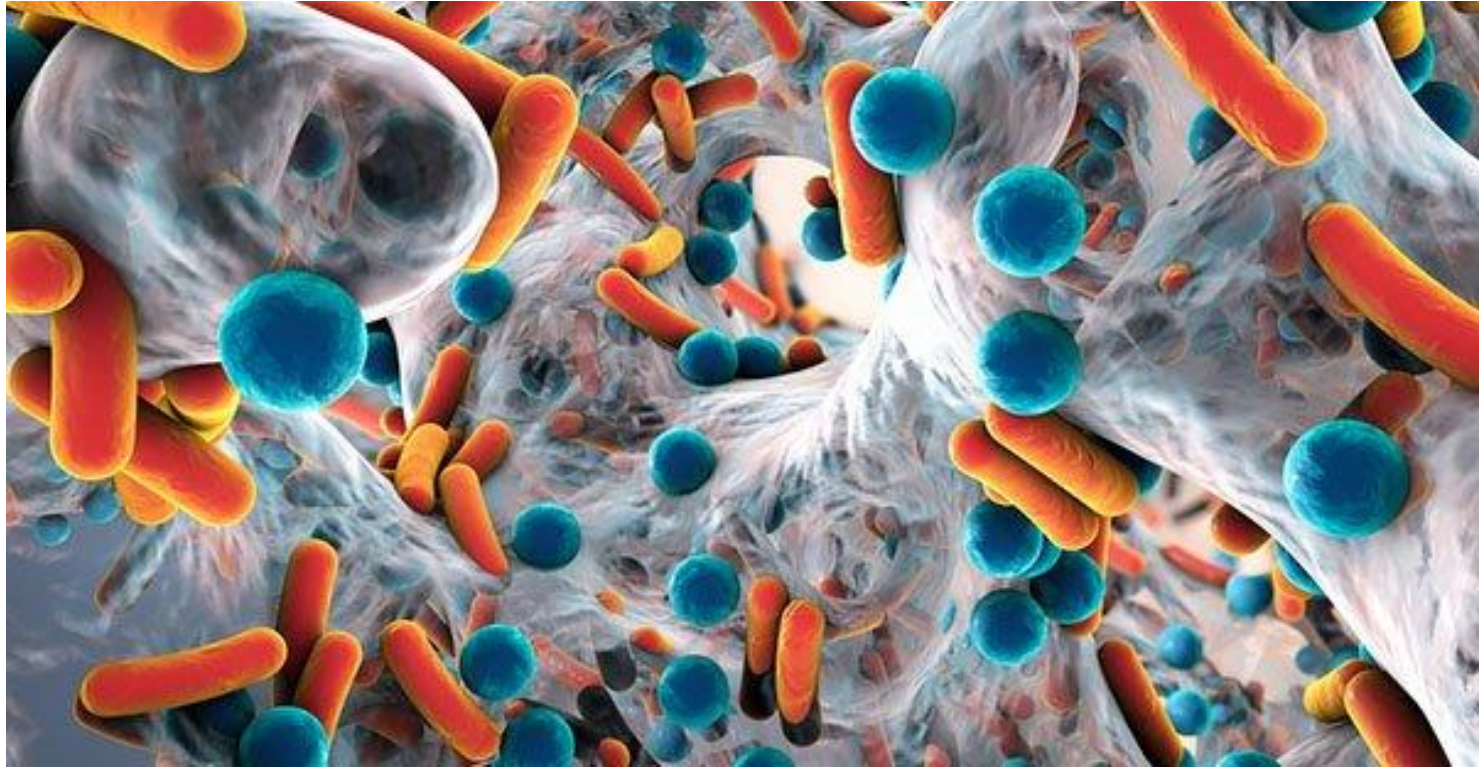
Lattoferrina

Lega Fe^{3+} → limita disponibilità Fe
Immunità nutrizionale

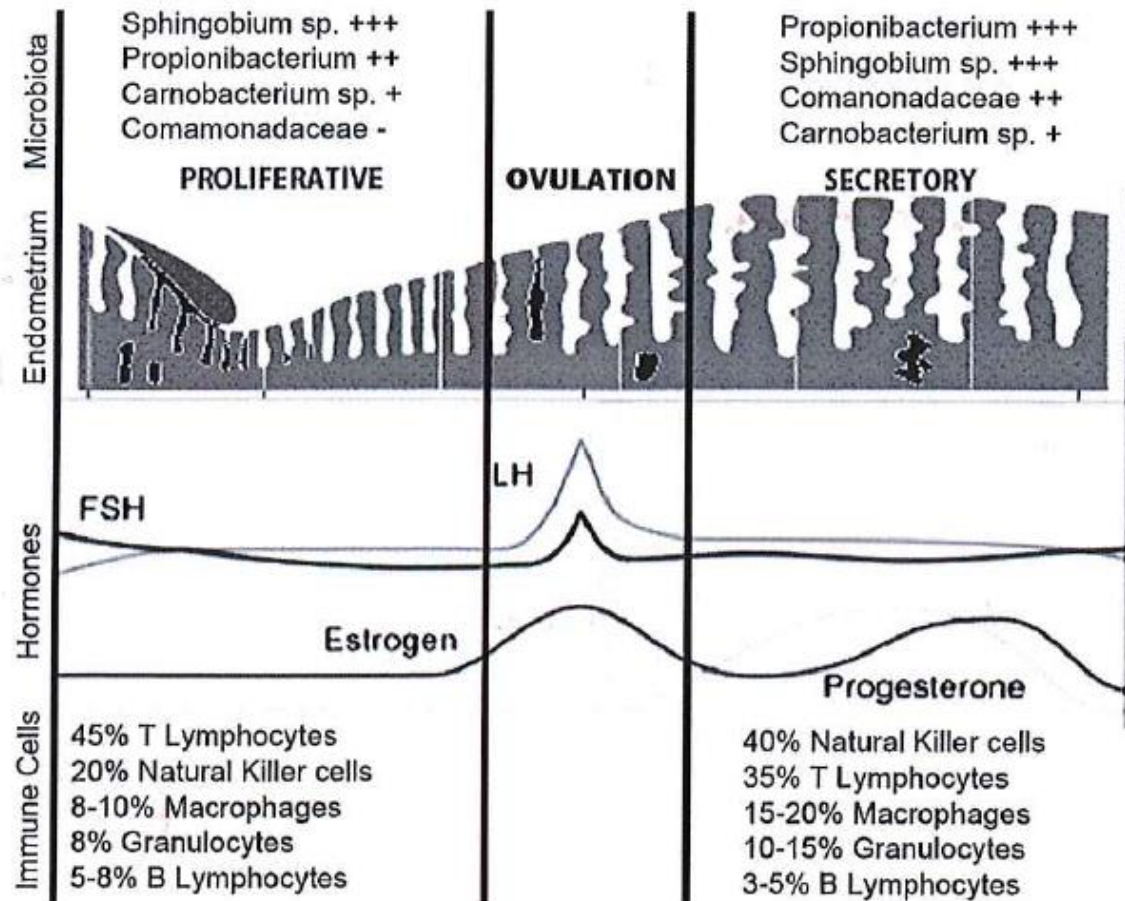
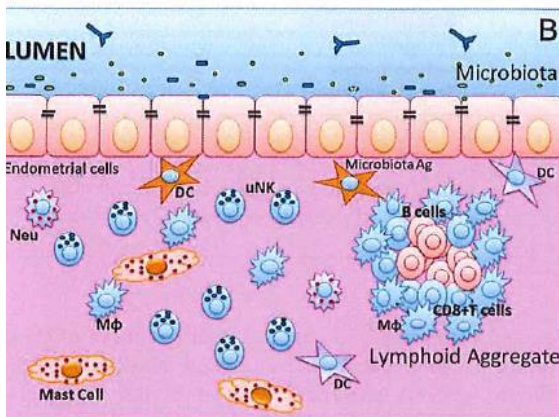
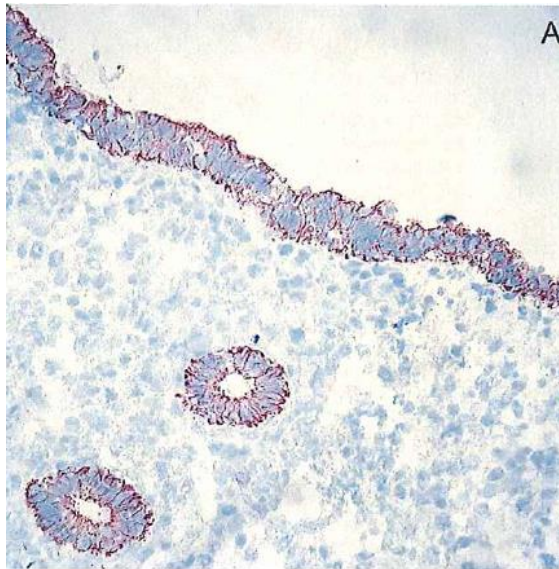
Il ferro viene usato

- **come cofattore nelle reazioni enzimatiche**
- **per trasporto di proteine**
- **per la regolazione di alcuni fattori trascrizionali**

Il microbiota



Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm

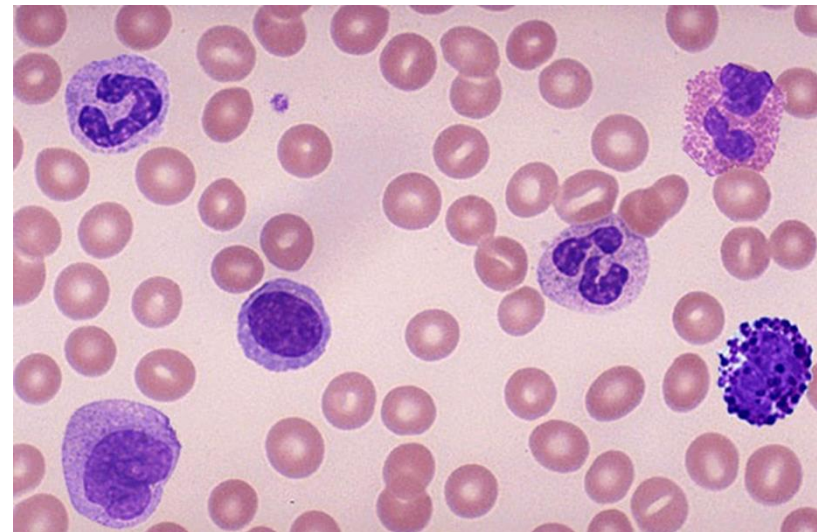
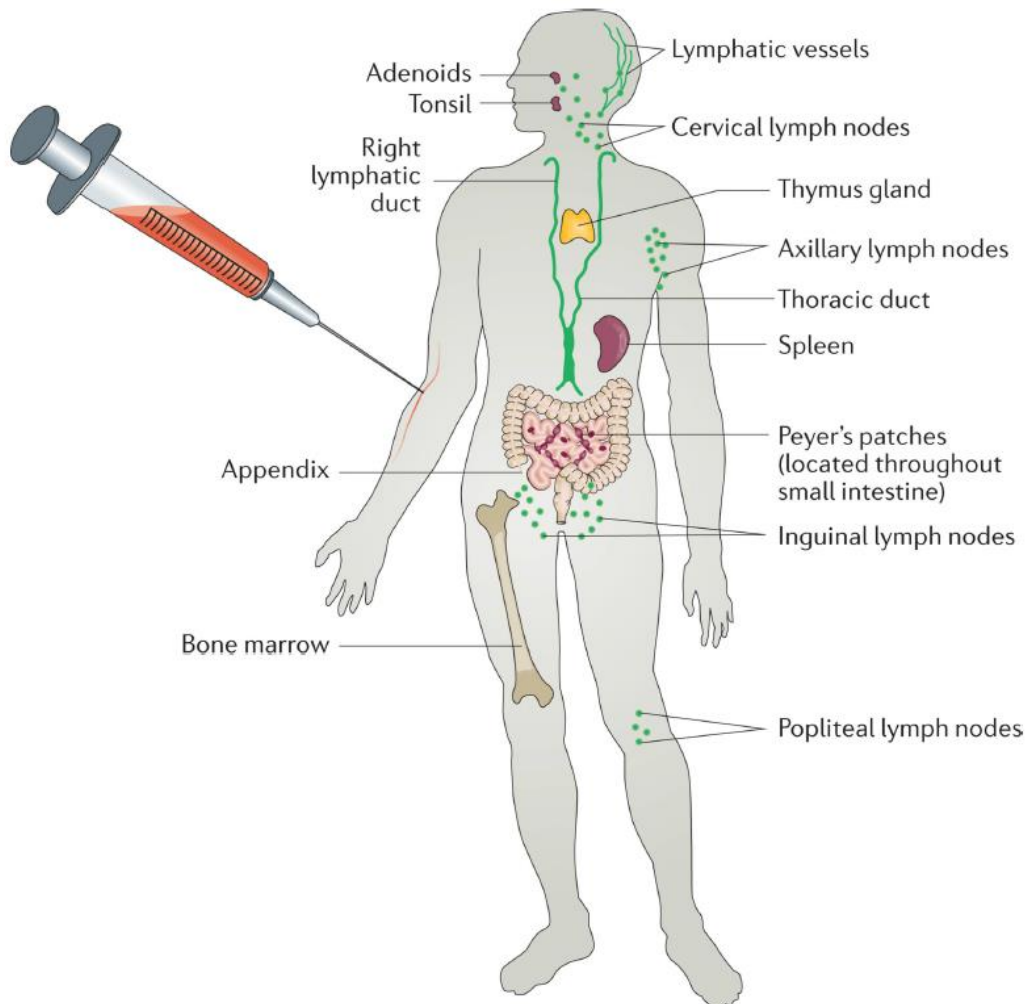


Immunità innata	Immunità acquisita	
Sistema del complemento	anticorpi	Componente umorale
Neutrofili Eosinofili Basofili Monociti- <i>macrofagi</i> Cellule NK <i>mastociti</i> <i>Cellule dendritiche</i>	Linfociti T Linfociti B	Componente cellulare

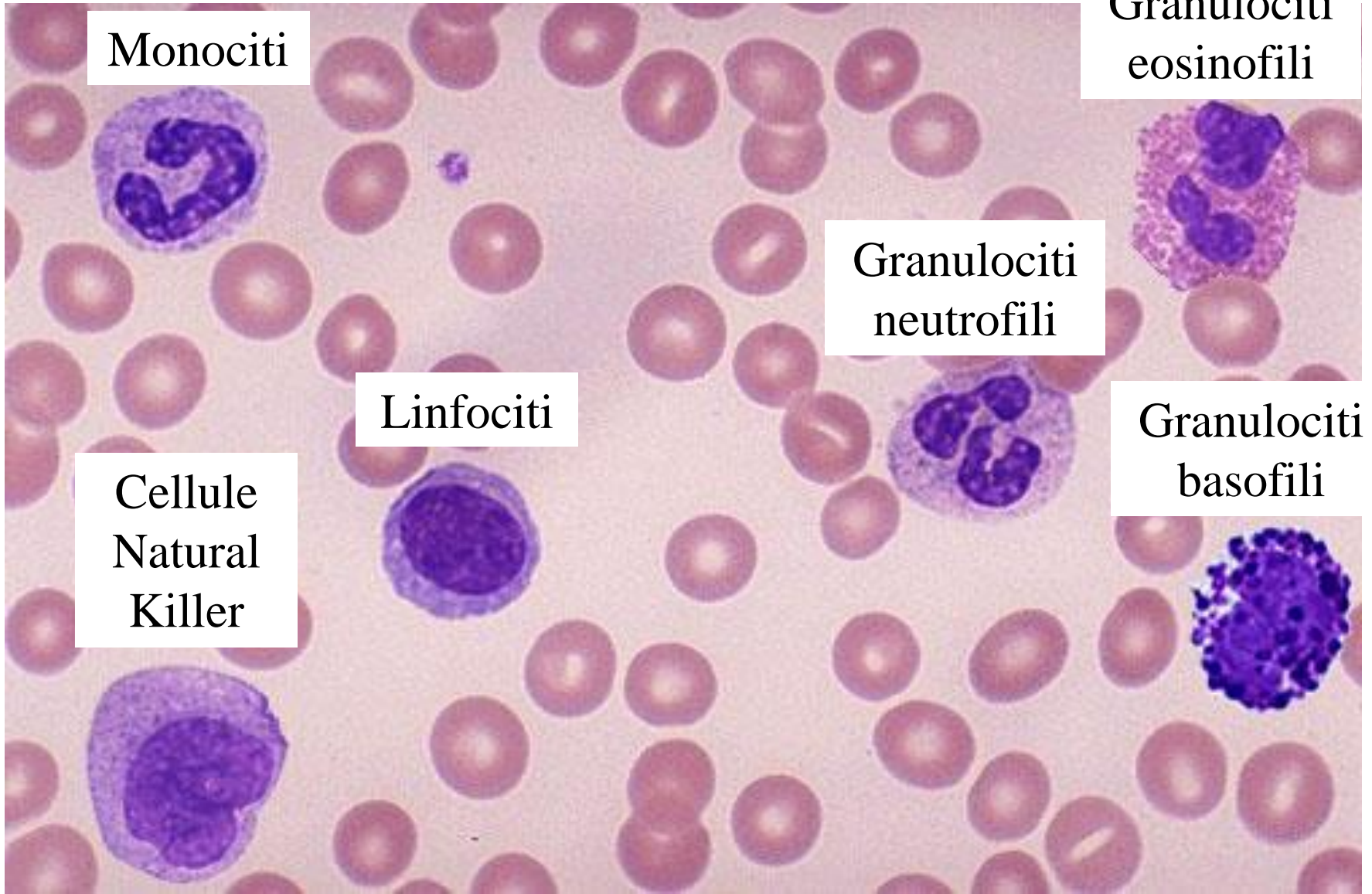
The blood as a window for global immune system analysis in humans

Brodin and Davis

Page 18

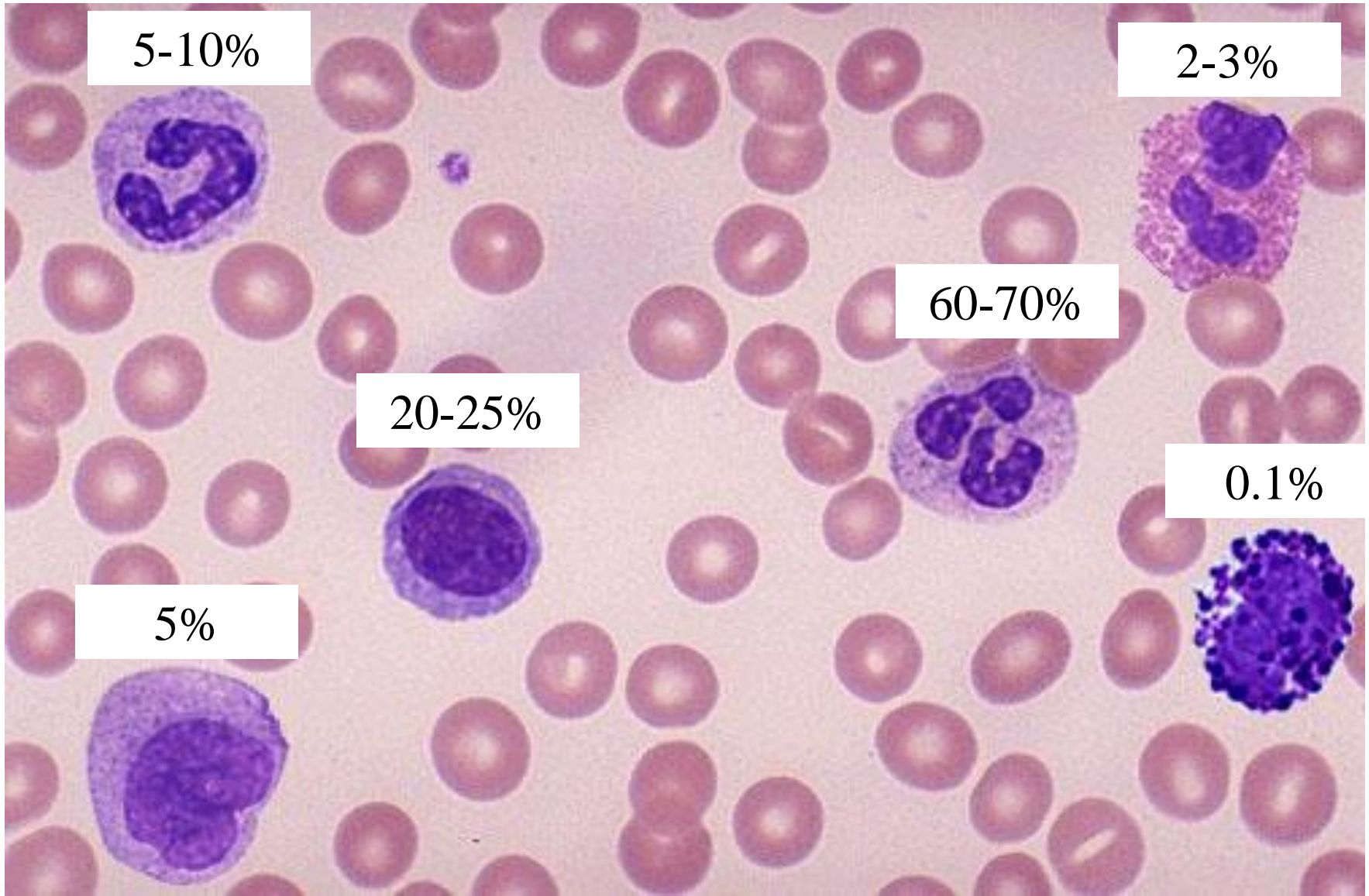


Leucociti circolanti



Leucociti circolanti

5000-10000/mm³

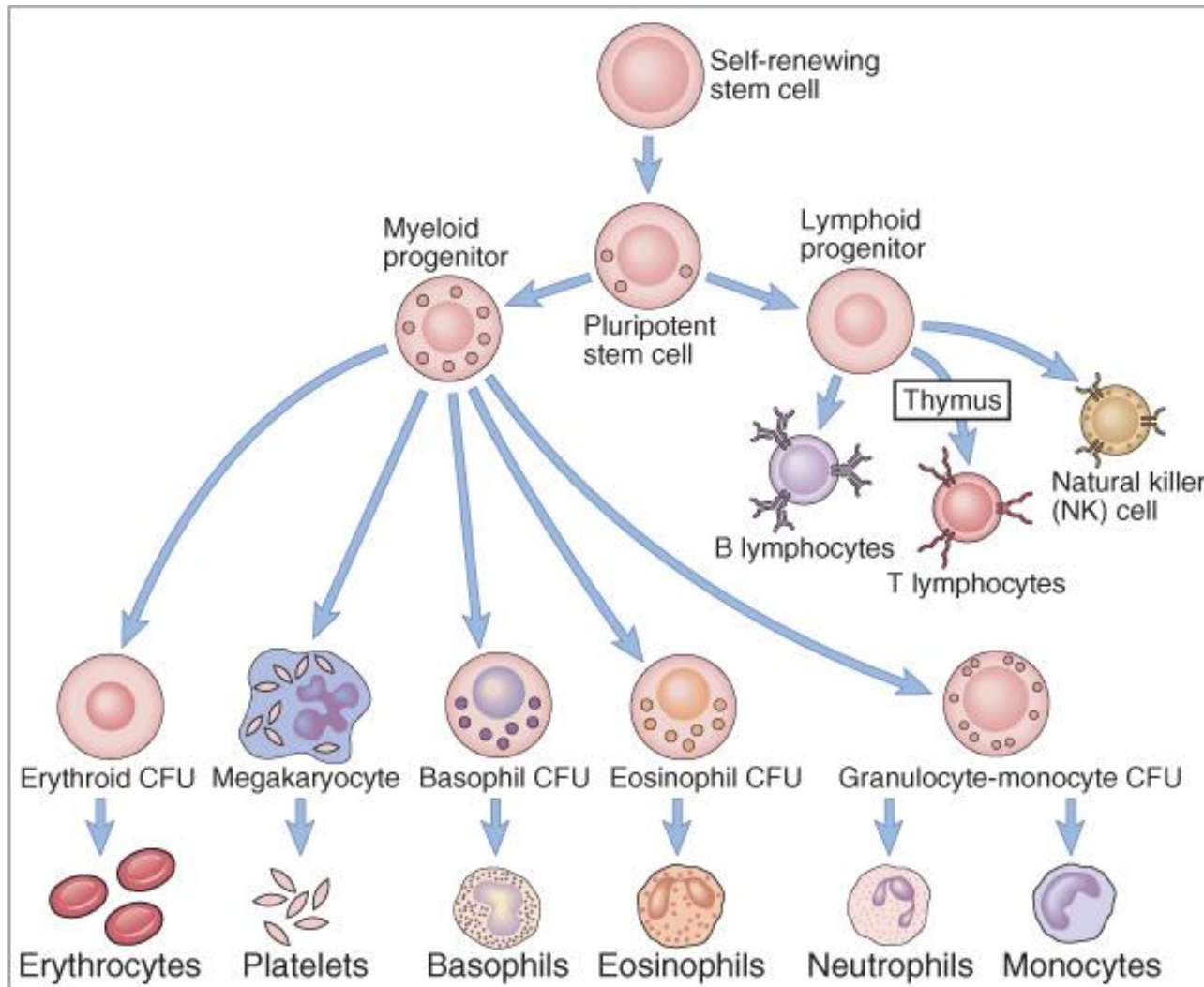


Le cellule effettrici del SI Innato

Le cellule effettrici più numerose del SI innato sono cellule derivate dal midollo osseo che circolano nel sangue e migrano nei tessuti.

Sono cellule di derivazione mieloide e linfoide.

Ematopoiesi



CFU=
unità formante
colonie

Effettori cellulari dell'immunità innata:

I granulociti

neutrofili

eosinofili

basofili

Hanno un caratteristico nucleo multilobato
(vengono definiti pertanto polimorfonucleati PMN)

Diametro 10-20um

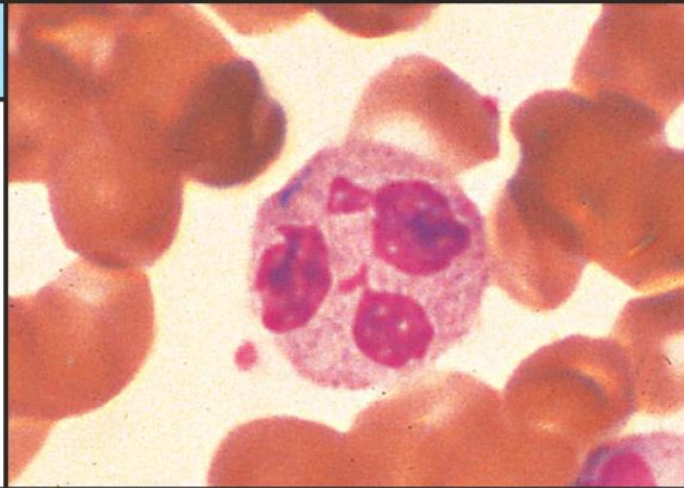
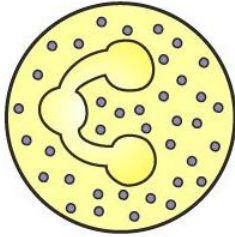
Hanno vita breve (ore nel sangue, gg nei tessuti)

Escono per **extravasazione** nei siti infiammatori

Rappresentano il 60-70% dei leucociti circolanti

Activated
function

Neutrophil



Phagocytosis
and activation
of bactericidal
mechanisms

I Granulociti neutrofili sono un tipo di granulociti il cui citoplasma contiene granulazioni caratteristiche ed un nucleo lobato ed hanno funzioni di difesa dell'organismo contro **infezioni batteriche e fungine**.

Principali cellule coinvolte nella
risposta infiammatoria acuta

Vengono chiamati **neutrofili** perché incorporano coloranti istologici, sia acidi sia basici (neutrofilo).

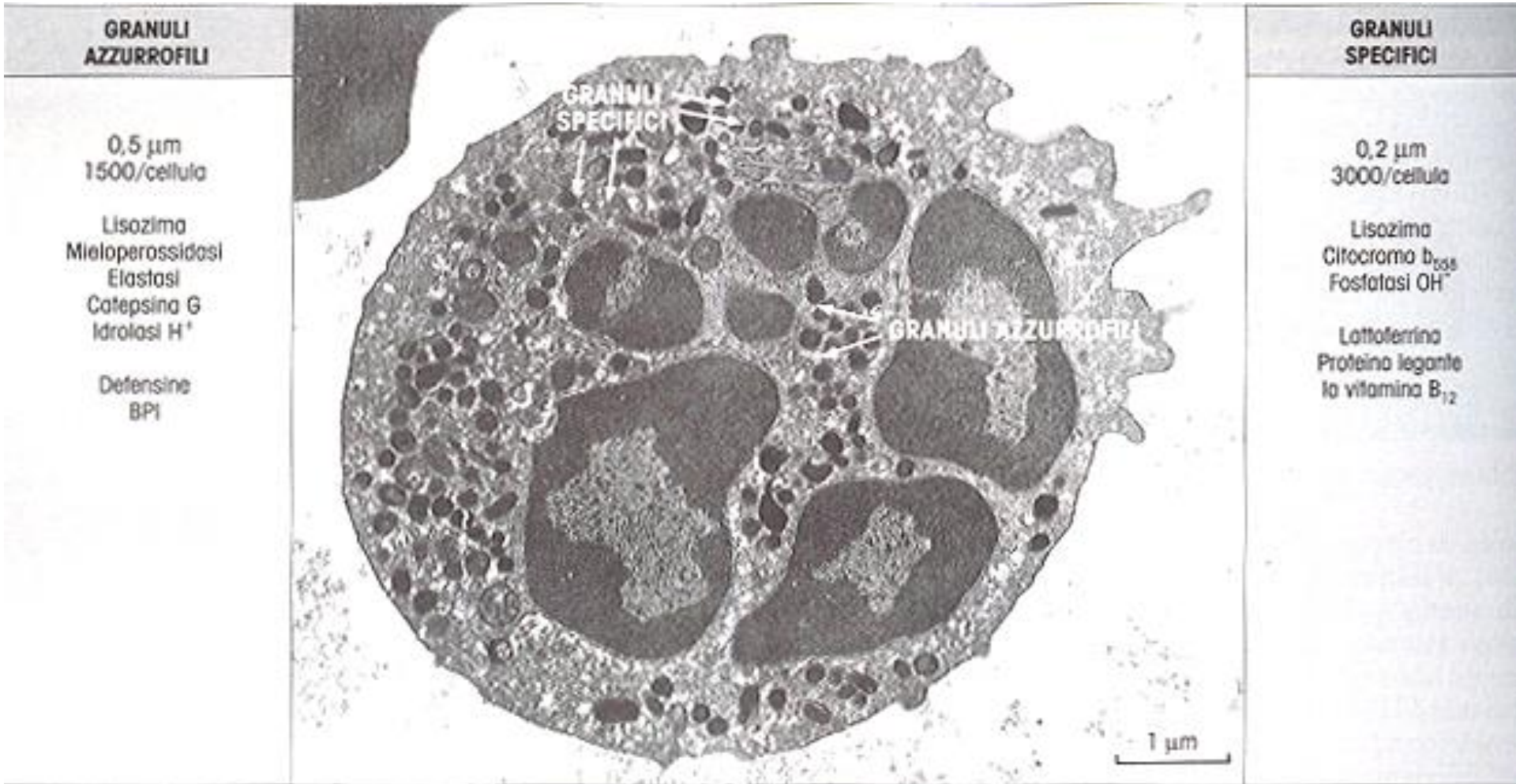
NEUTROFILI

- 4000-10000 per uL
- In risposta all'infezione si ha un rapido incremento della produzione dei N nel midollo osseo fino a 20000 cellule per uL nel sangue
- La loro produzione è stimolata da fattori che stimolano le colonie (CSF)

NEUTROFILI

- Ingeriscono i microbi presenti nel torrente ematico e nei focolai infettivi nei tessuti extravascolari
- Muoiono nel giro di poche ore (degenerano dopo un singolo episodio di attività)
- **I neutrofili morti sono i principali costituenti cellulari del pus**

I I granuli contengono peptidi antimicrobici e enzimi proteolitici



CD32, CD16

-granuli terziari contenenti gelatinasi

EOSINOFILI

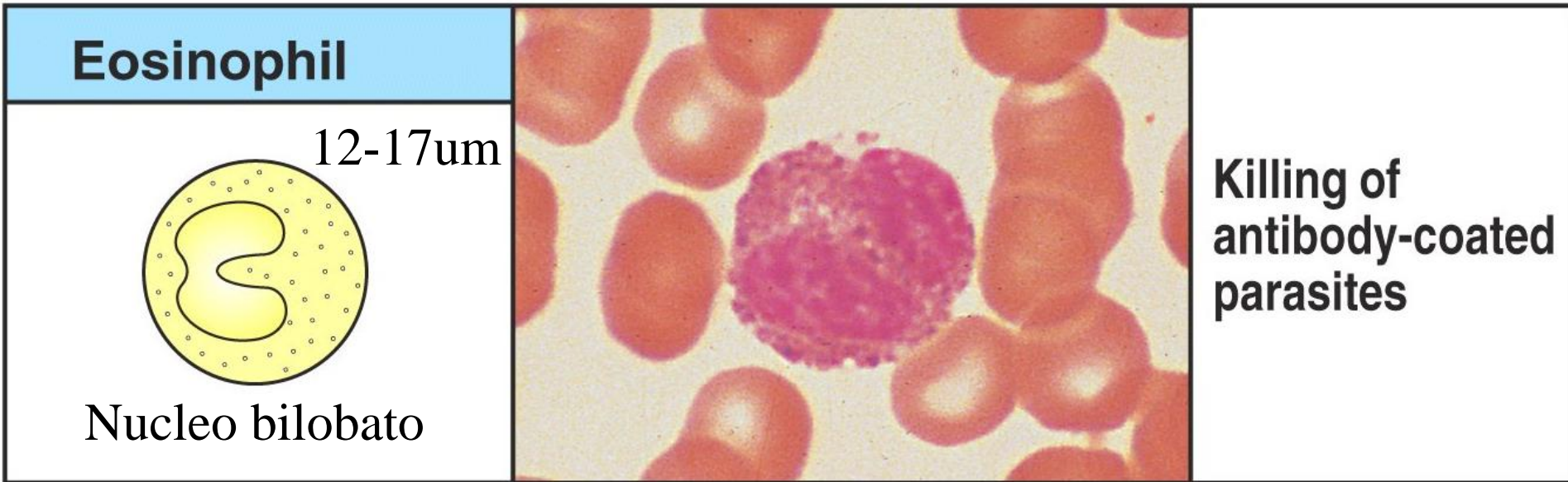
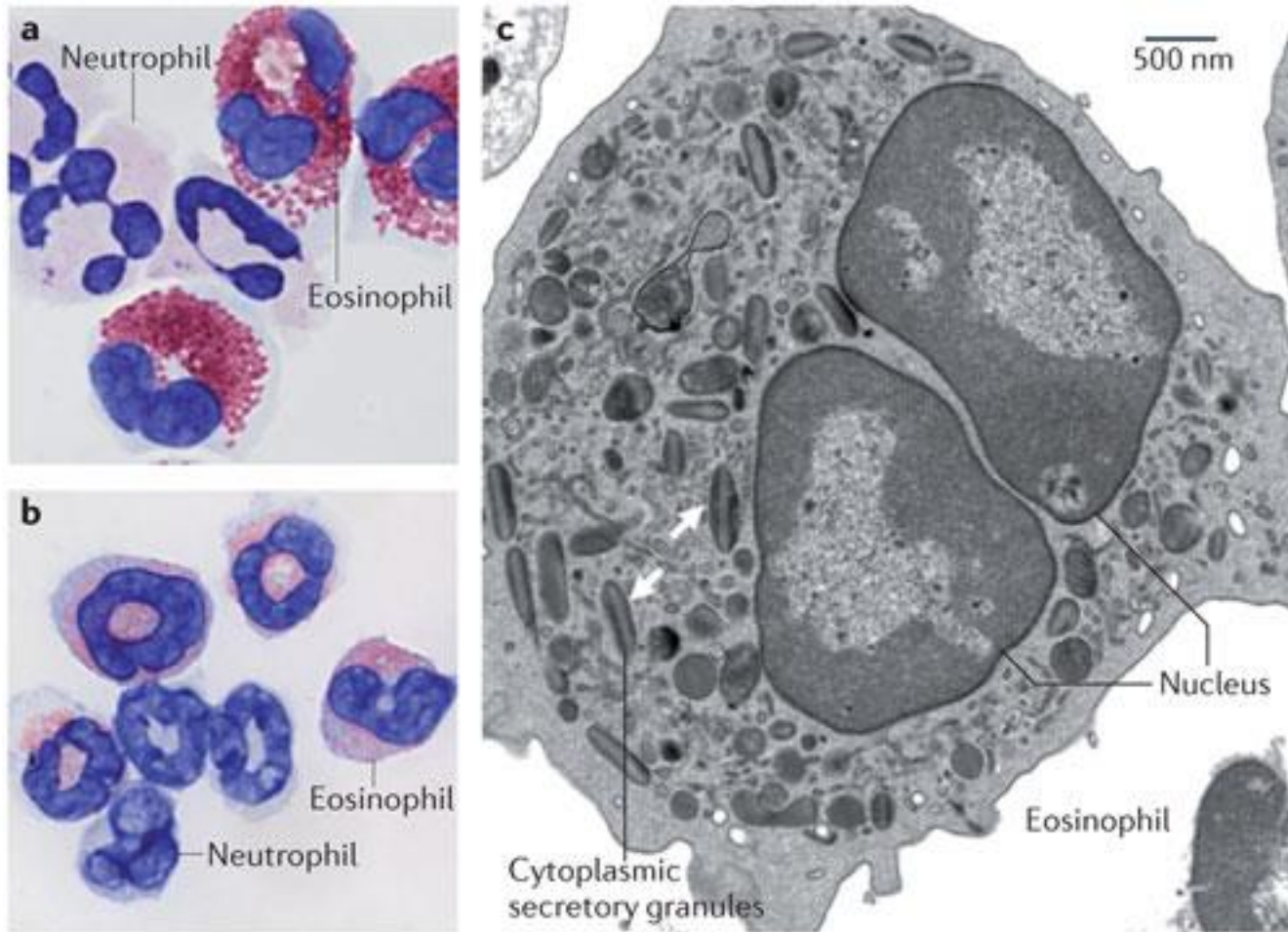


Figure 1-4 part 2 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

il numero aumenta in seguito a infezioni parassitarie e in alcuni stati di ipersensibilità

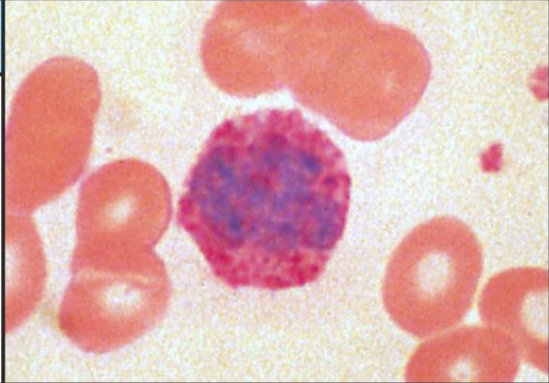

EOSINOFILI



Nature Reviews | Immunology

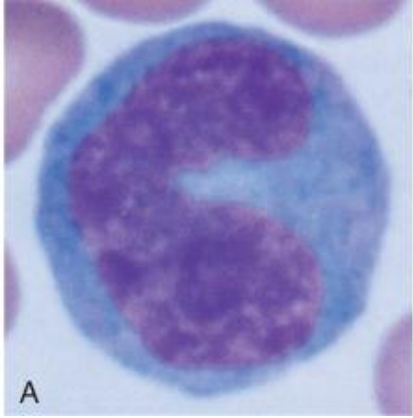
- the central core of these granules contains cationic major basic protein, and their periphery contains the remaining major cationic proteins, cytokines, chemokines, growth factors and enzymes

BASOFILI

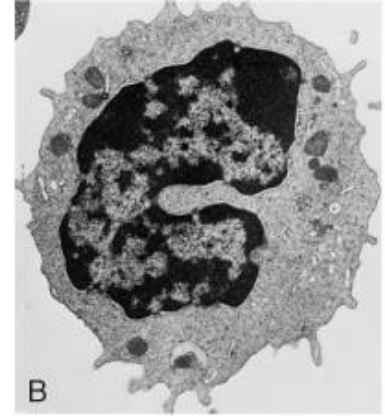
Cell		Activated function
Basophil		Unknown
		

I granuli contengono: eparina, istamina, perossidasi, fosfatasi acida e molti altri mediatori chimici dei processi infiammatori come proteasi neutre e $\text{TNF-}\alpha$

come i mastociti, i granulociti basofili liberano anche leucotrieni, sostanze coinvolte nella contrazione della muscolatura liscia.



Monociti



- Prendono parte sia al meccanismo innato che specifico di difesa del SI
- 10-18mm
- 1-6% dei leucociti circolanti (500-1000 per ul)
- Nucleo a forma di rene
- Contengono deboli granuli azzurrofilo e numerosi lisosomi

Possono differenziarsi in macrofagi o cellule dendritiche

Macrofagi

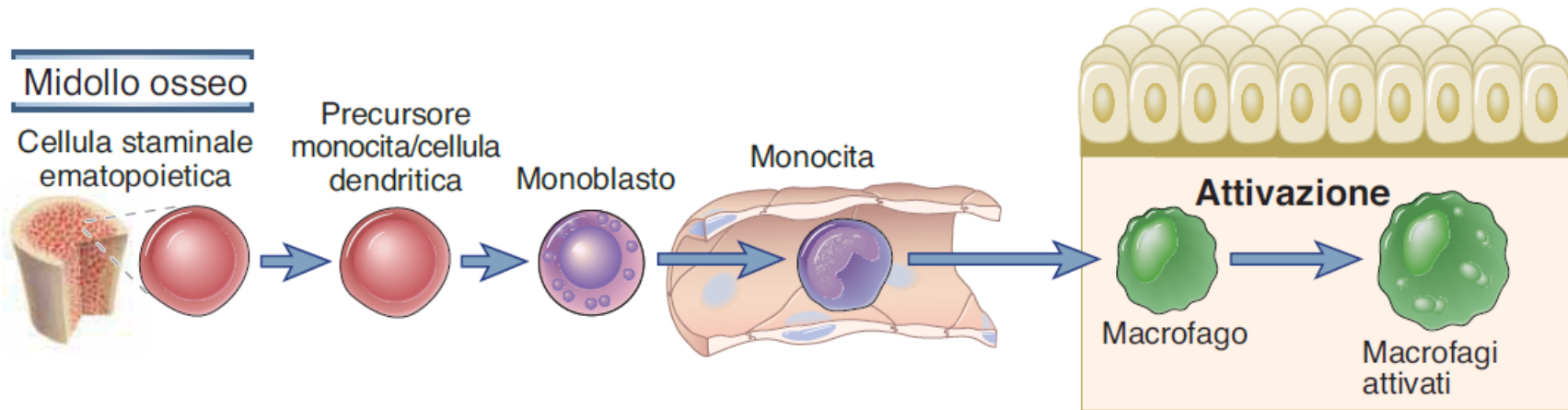
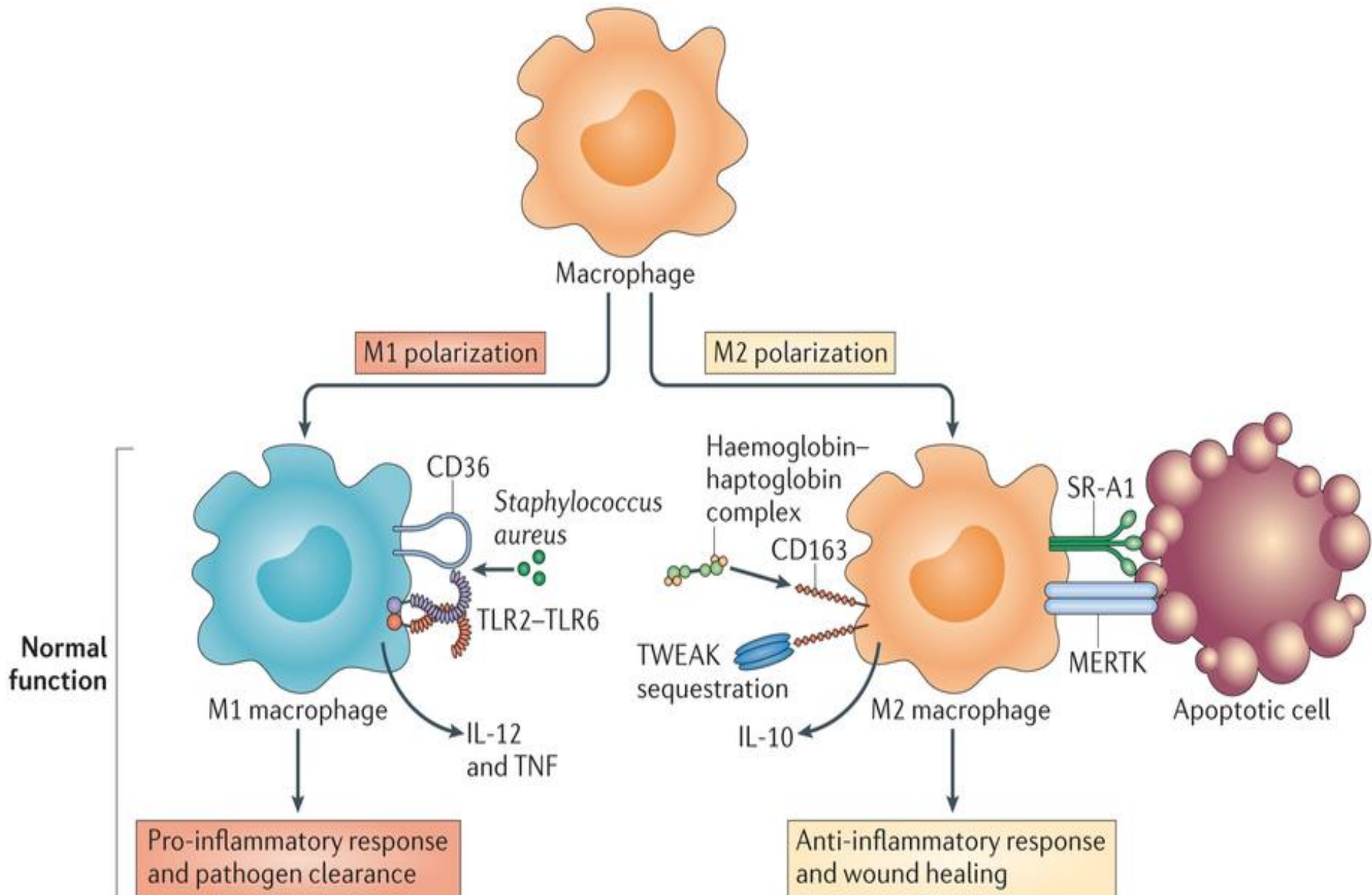
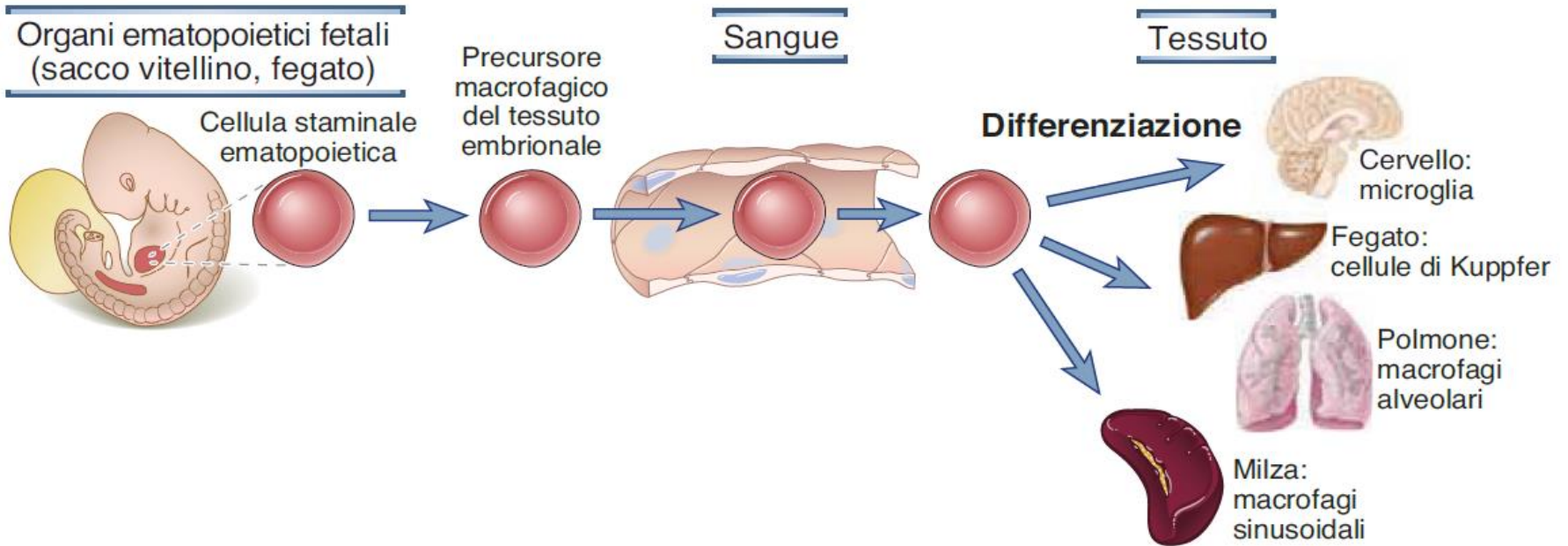


FIGURA 2-2 **Maturazione dei fagociti mononucleati e delle cellule dendritiche.** I macrofagi tissutali residenti, che si differenziano in forme specializzate in particolari organi, derivano da precursori presenti nel sacco vitellino e nel fegato durante la vita fetale. I monociti derivano da un precursore mieloide midollare, circolano nel sangue e sono presenti nei tessuti durante le reazioni infiammatorie, dove subiscono una successiva maturazione divenendo macrofagi. Esiste un tipo di monociti ematici che possiede delle funzioni infiammatorie distinte o riparative (non mostrato in figura).

Polarizzazione dei macrofagi



Macrofagi tissutali



Il sistema dei fagociti mononucleati

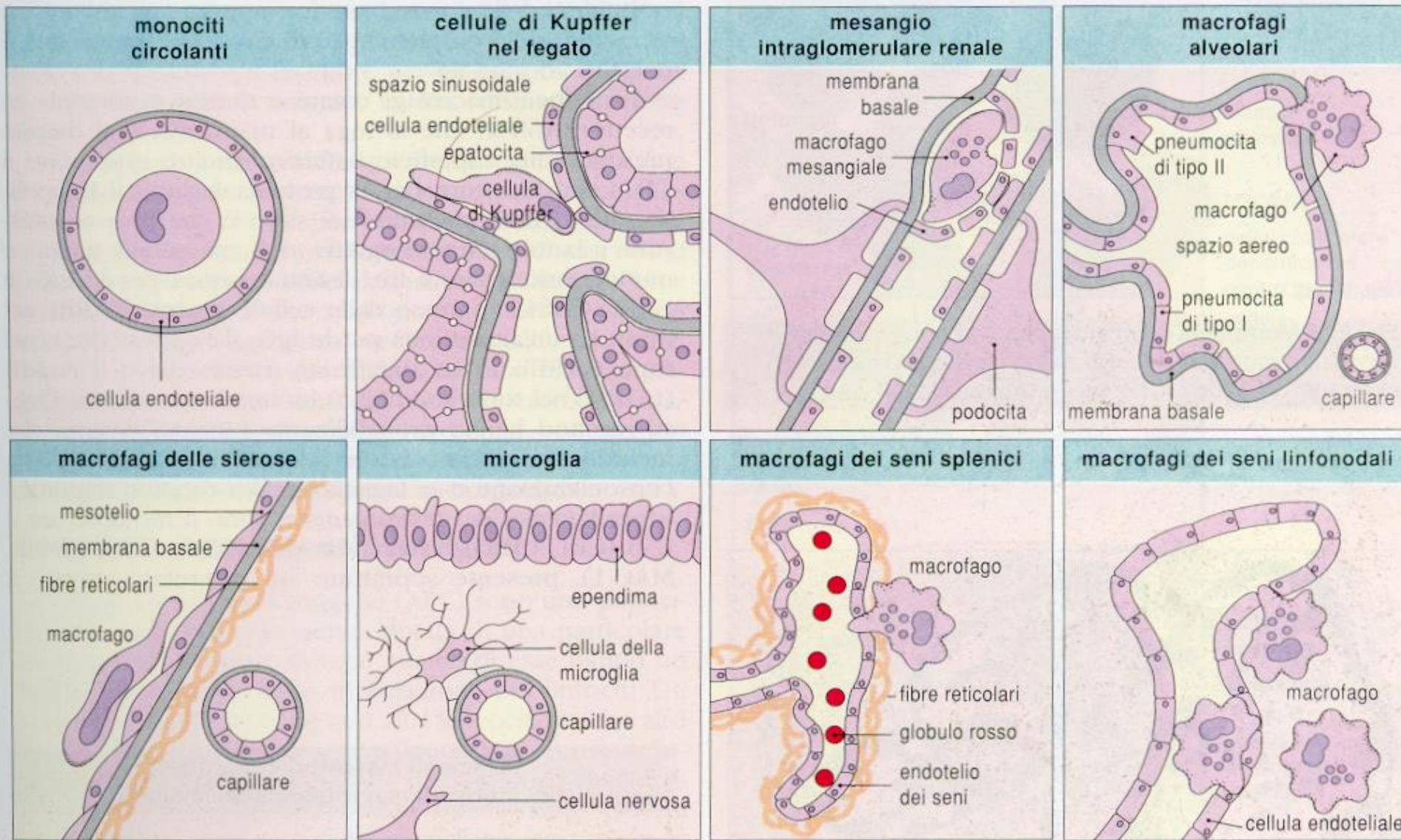
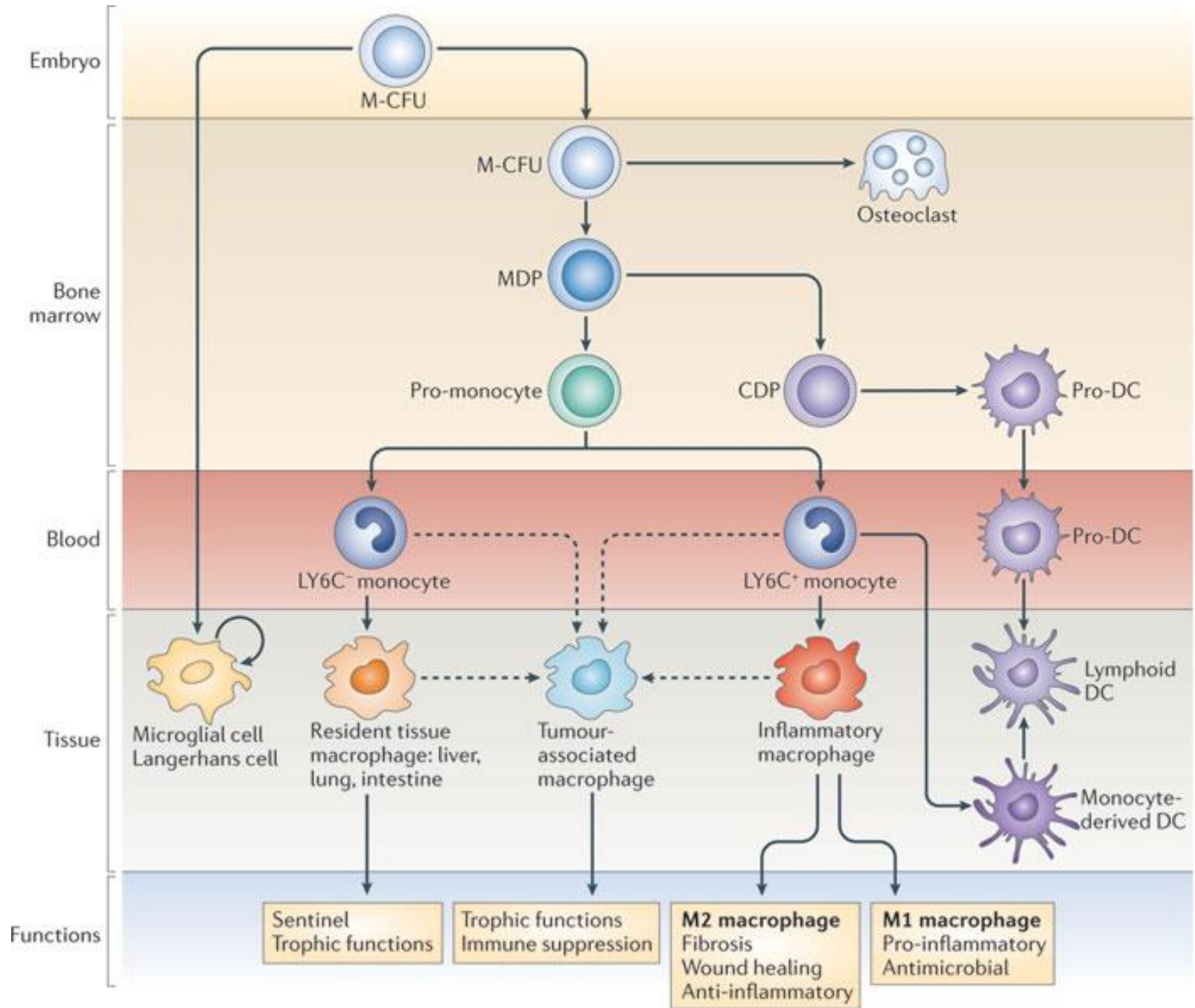


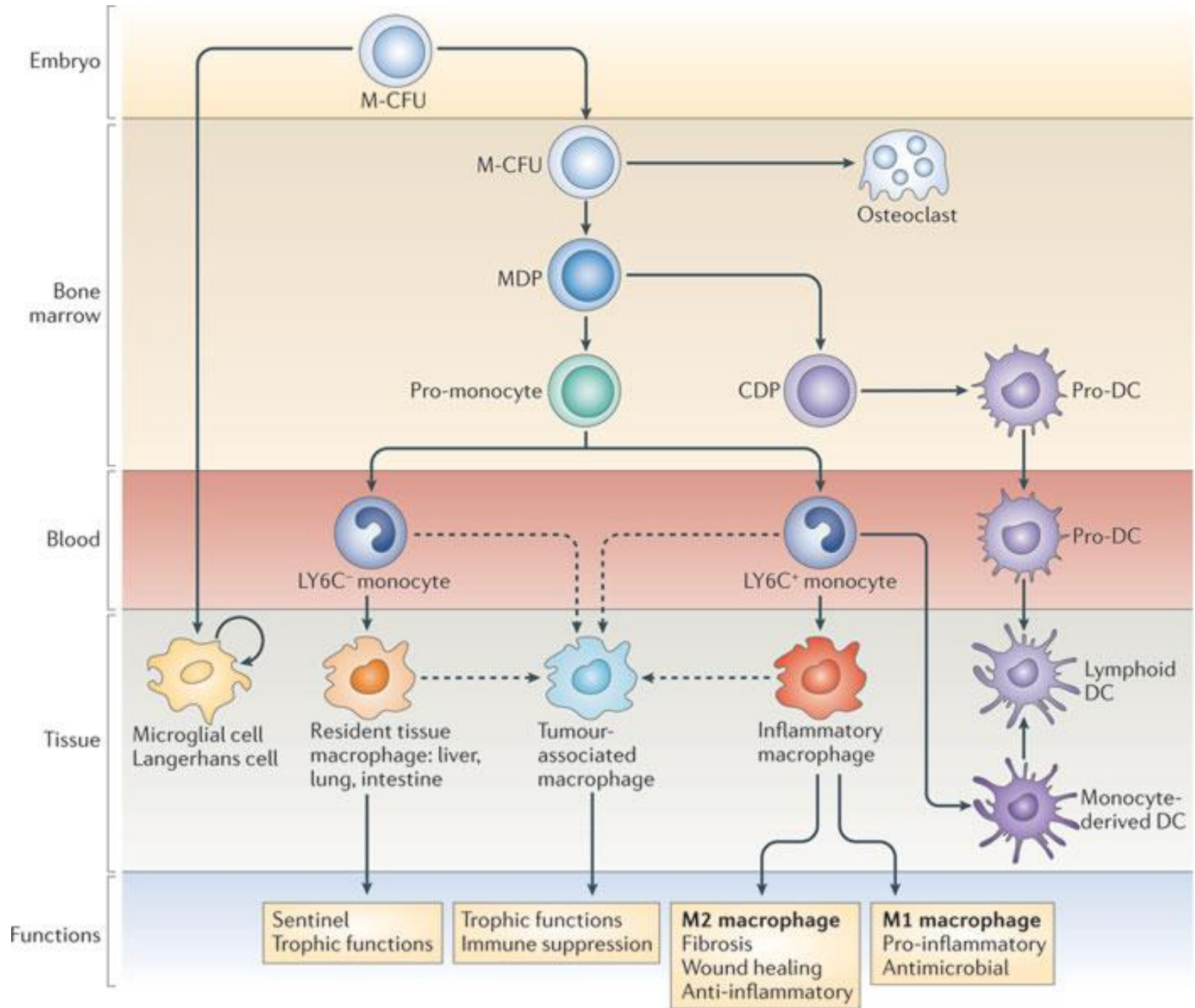
Fig. 2.26 Questo sistema include monociti circolanti e fagociti fissi tessutali o aderenti alle cellule endoteliali dei capillari. Nel fegato queste ultime sono note come cellule di Kupffer, nel rene come cellule mesangiali intraglomerulari. I macrofagi alveolari (o

delle sierose, ad esempio peritoneali) sono degli esempi di macrofagi ricircolanti, mentre le cellule della microglia arrivano nell'encefalo al tempo della nascita e si sviluppano come macrofagi fissi.

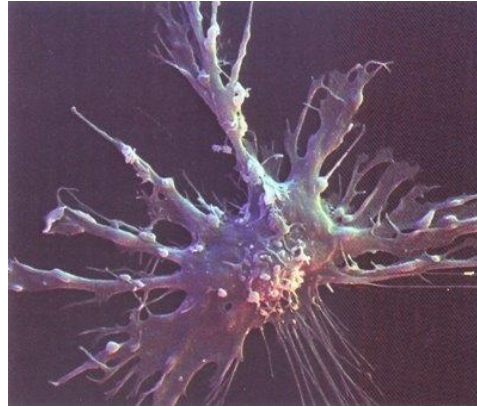


Macrofagi

- Ingerire ed uccidere microbi
- Ingerire e degradare cellule morte
- Sintesi citochine
- Riparazione tessuti danneggiati, angiogenesi
- Presentare gli antigeni alle cellule T

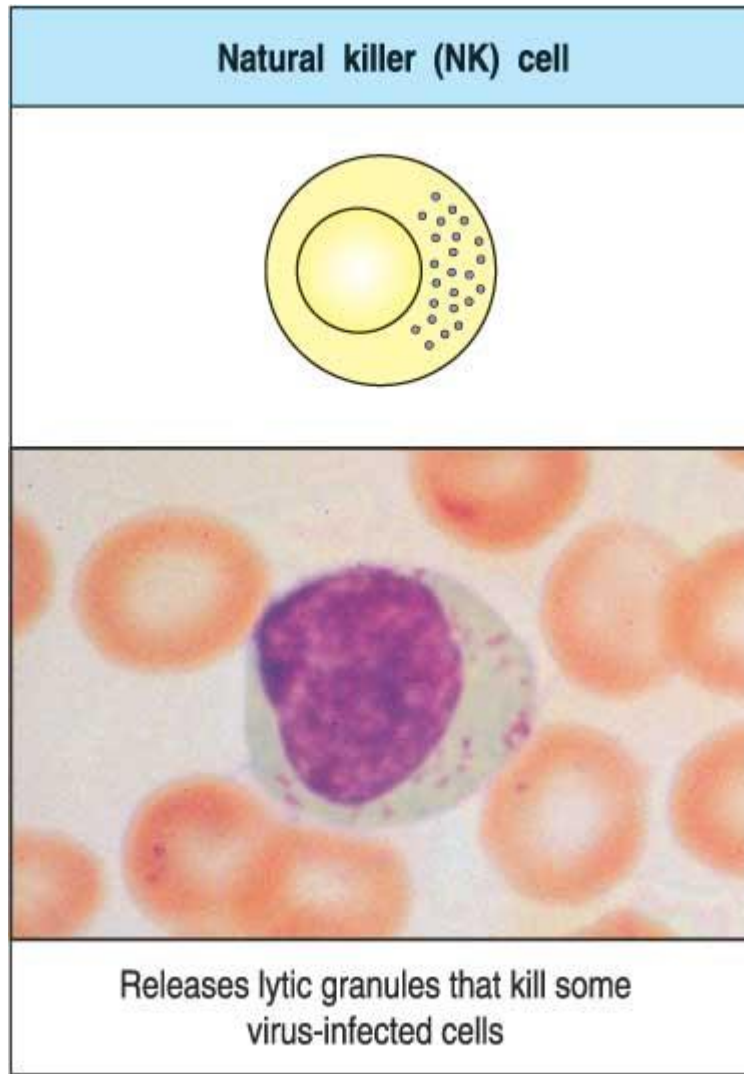


Cellule dendritiche



- Caratterizzate da lunghe protrusioni della membrana e capacità fagocitica e sono ampiamente distribuite nei tessuti linfoidei, nell'epitelio delle mucose e nel parenchima degli organi
- Svolgono ruoli importanti nelle risposte innate alle infezioni e nel collegare l'immunità innata a quella adattativa

Cellule Natural Killer



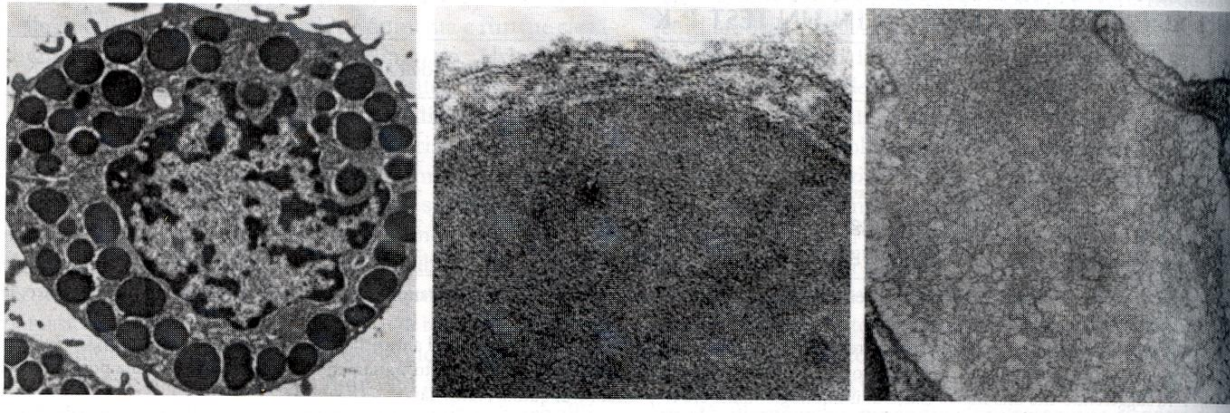
Le cellule NK fanno parte di un tipo cellulare definito sulla base di proprietà morfologiche con il termine di grandi linfociti granulari (LGL).

Sono il 50% più grandi dei linfociti a riposo

Hanno evidenti granuli citoplasmatici

Stem Cell Factor (ligando di cKit)
è essenziale per il loro sviluppo

Mastcellule

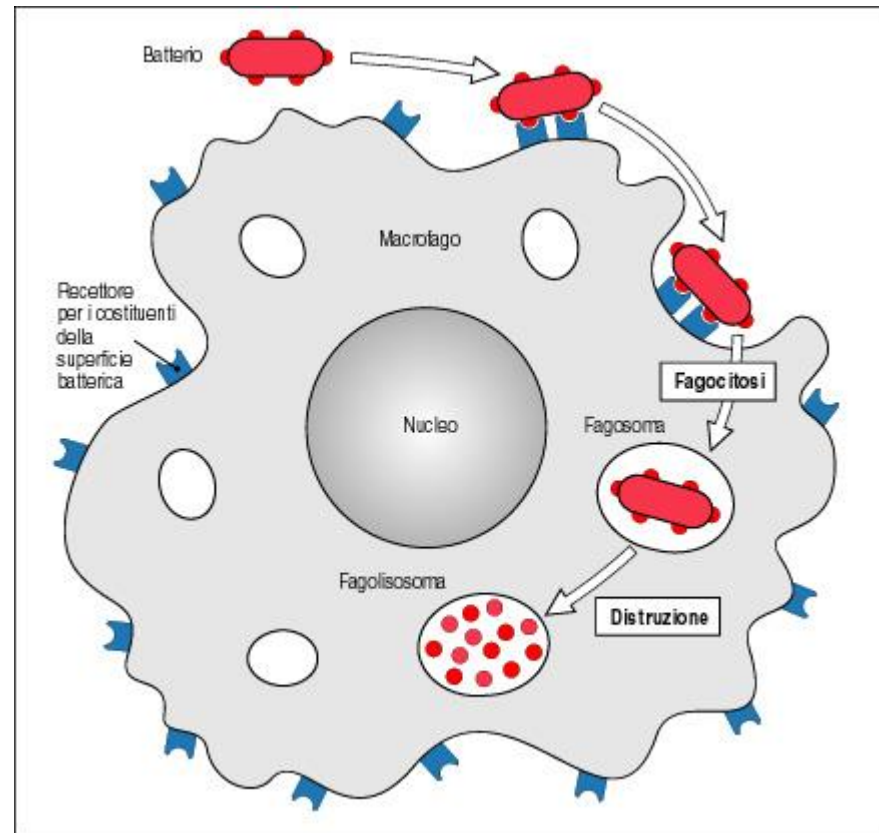


- Si trovano in numerosi tessuti tra i quali la cute, il tessuto connettivo di vari organi ed il tessuto epiteliale mucoso dei tratti respiratorio genitourinario e digestivo
- adiacenti ai vasi sanguigni e nervi.
- Hanno numerosi granuli citoplasmatici contenenti istamina e altre sostanze farmacologicamente attive
- svolgono un ruolo chiave nella difesa contro i parassiti e nello sviluppo di allergie
- Generalmente ricoperte di IgG ed IgE

MECCANISMI EFFETTORI DEI FAGOCITI

**NEUTROFILI
MACROFAGI**

LA FAGOCITOSI

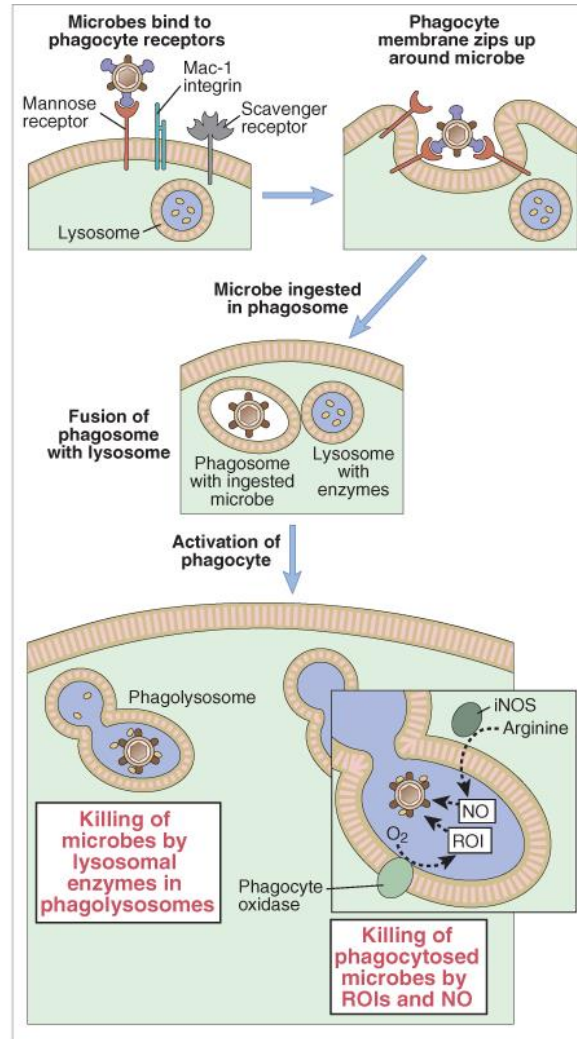


Agenti battericidi prodotti o rilasciati dai fagociti

Tipi di meccanismi	Prodotti specifici
Acidificazione	pH≈3,5 – 4,0, batteriostatica o battericida
Derivati tossici dell'ossigeno	Superossido O_2^- , perossido idrogeno H_2O_2 , ossigeno singoletto 1O_2 , radicale idrossile OH^* , ipoclorite OCl
Ossidi d'azoto tossici	Ossido nitrico NO
Peptidi antimicrobici	Defensine e proteine cationiche
Enzimi	Lisozima — dissolve parete cellulare di batteri gram-positivi Idrolasi acida — digerisce ulteriormente i batteri
Competitori	Lattoferrina (lega Fe) e proteina legante vitamina B ₁₂

Fig. 2.6 Gli agenti battericidi prodotti o rilasciati dai fagociti durante l'ingestione dei microrganismi. La maggior parte di questi agenti sono prodotti sia dai macrofagi che dai neutrofilo. Alcuni di essi sono tossici; altri, come la lattoferrina, agiscono legando nutrienti essenziali e, in tal modo, impediscono che vengano utilizzati dai batteri. Le stesse sostanze possono essere rilasciate dai fagociti che interagiscono con superfici rivestite da anticorpi come vermi parassiti o tessuti dell'ospite. Dato che questi agenti sono tossici anche per le cellule dell'ospite, l'attivazione dei fagociti può provocare danni tessutali estesi, durante un'infezione.

MECCANISMI DI UCCISIONE OSSIGENO DIPENDENTI



**Metaboliti intermedi
reattivi dell'ossigeno
(ROI)**

**metaboliti intermedi
reattivi dell'azoto
(RNI)**

Metaboliti intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI)

IFN- γ

TLRs



O_2^- anione superossido

$OH\cdot$ radicale ossidrile

OH^- ione idrossido

$O_2\cdot$ Ossigeno singolo

H_2O_2 perossido di idrogeno

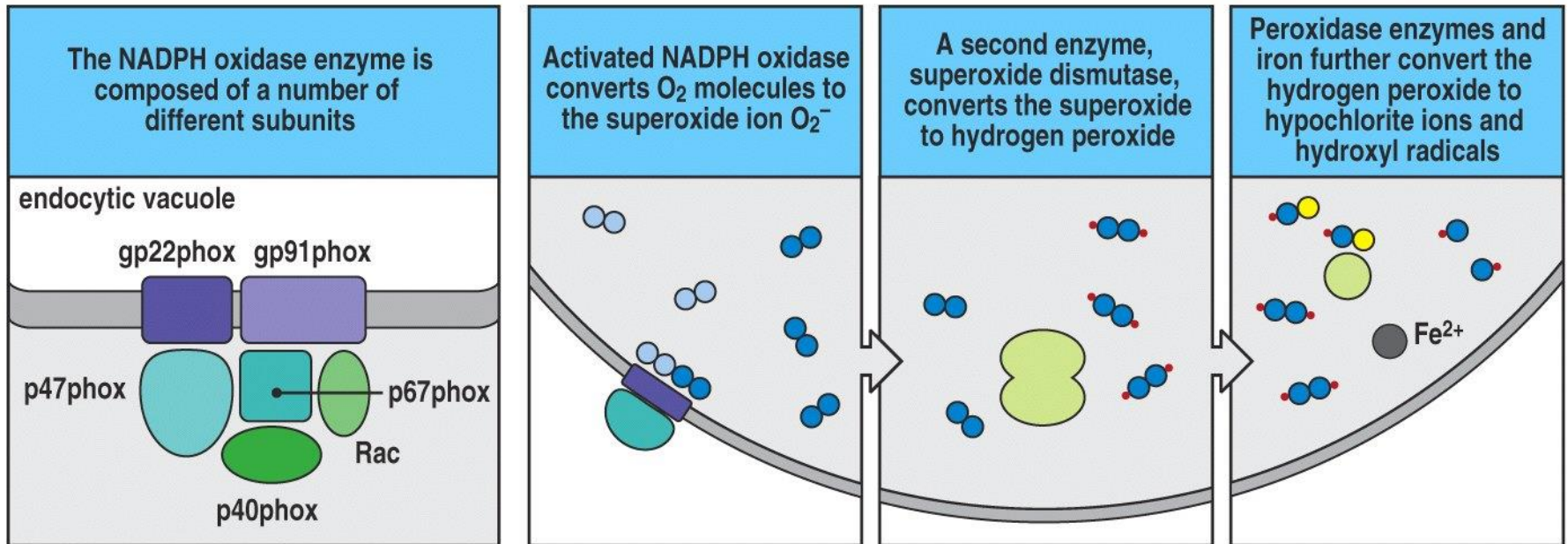
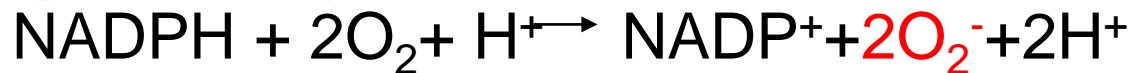


Figure 2-7 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)



NADPH ossidasi

NADPH= nicotinamide adenin-dinucleotide fosfato (cofattore)

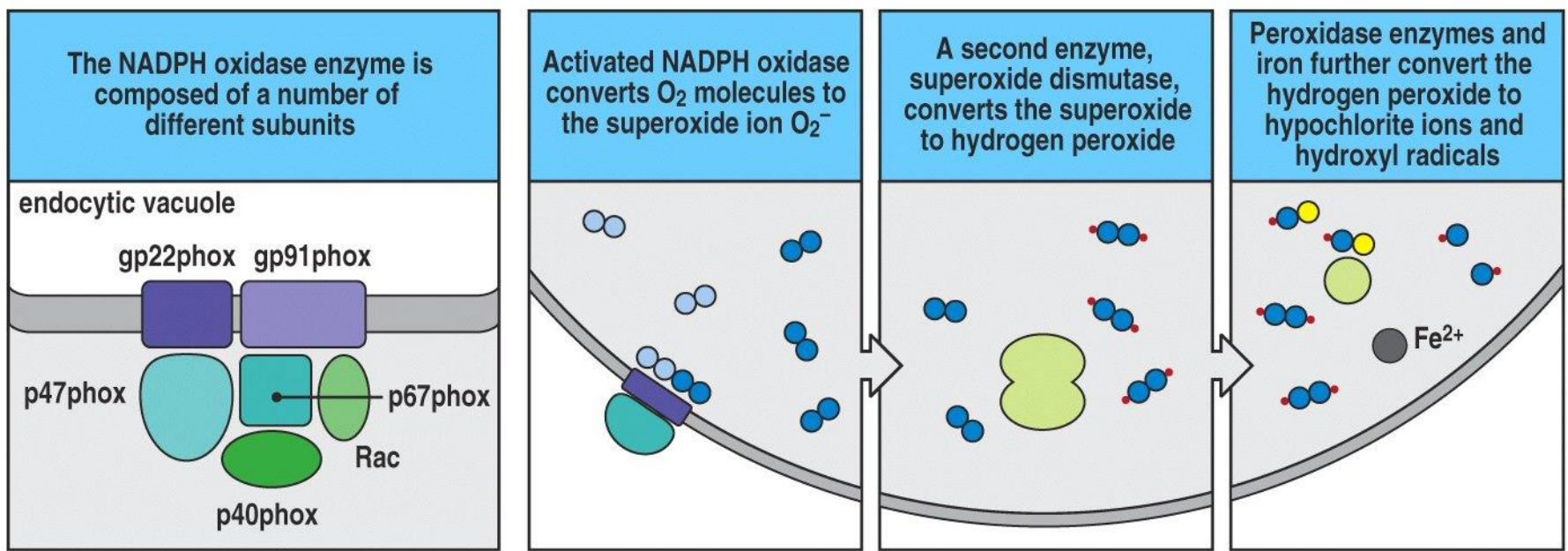
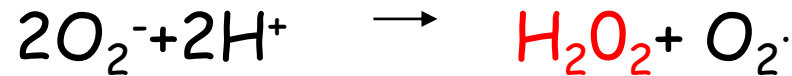
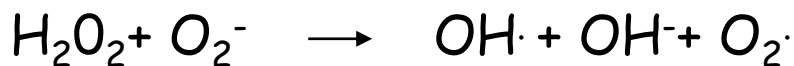


Figure 2-7 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)



superossido-dismutasi

L'anione superossido genera altri potenti agenti ossidanti



O_2^- anione superossido

$OH\cdot$ radicale ossidrilico

OH^- ione idrossido

O_2 Ossigeno singoletto

H_2O_2 perossido di idrogeno

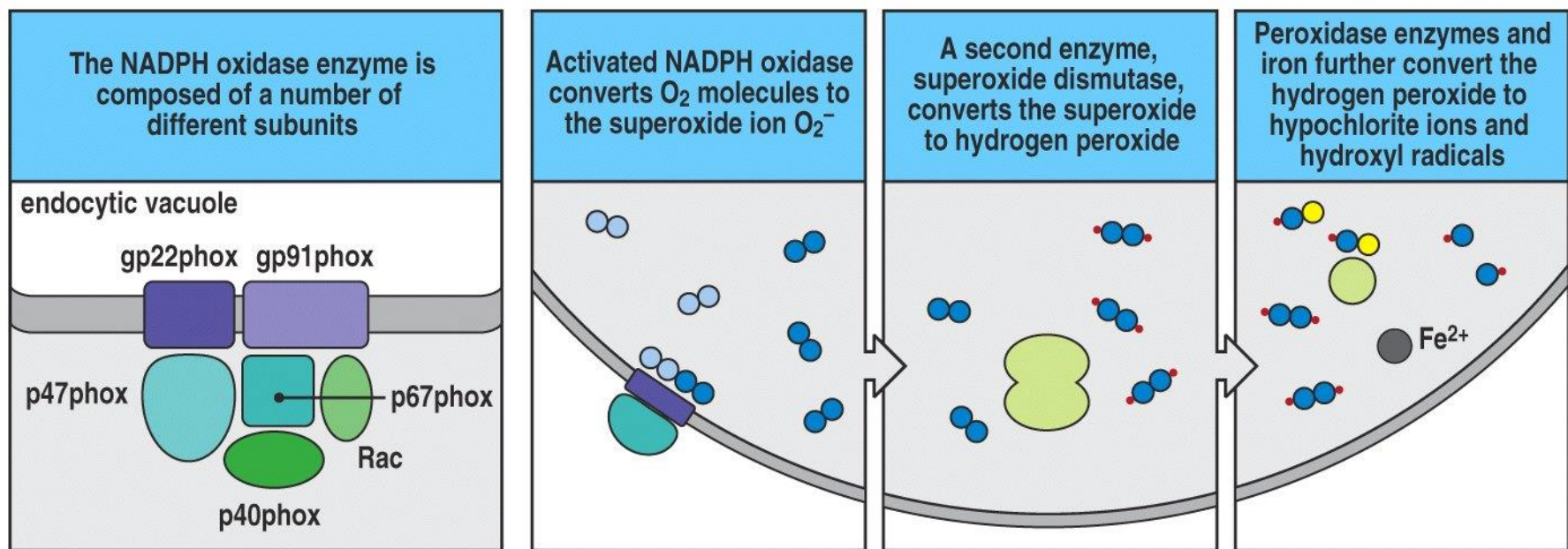


Figure 2-7 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)



Mieloperossidasi (MPO)

Quando il lisosoma si fonde con il fagosoma, la MPO agisce sull' H_2O_2 insieme a uno ione alogenuro (ioduro, bromuro, cloruro) e produce agenti ossidanti più durevoli e estremamente tossici.

Metaboliti intermedi reattivi dell'azoto (RNI)

NO Ossido nitrico
NO₂ biossido di azoto
HNO₂ Acido nitroso
NH₂Cl Monocloroamina




Sintetasi inducibile
dell'ossido nitrico
(iNOS)

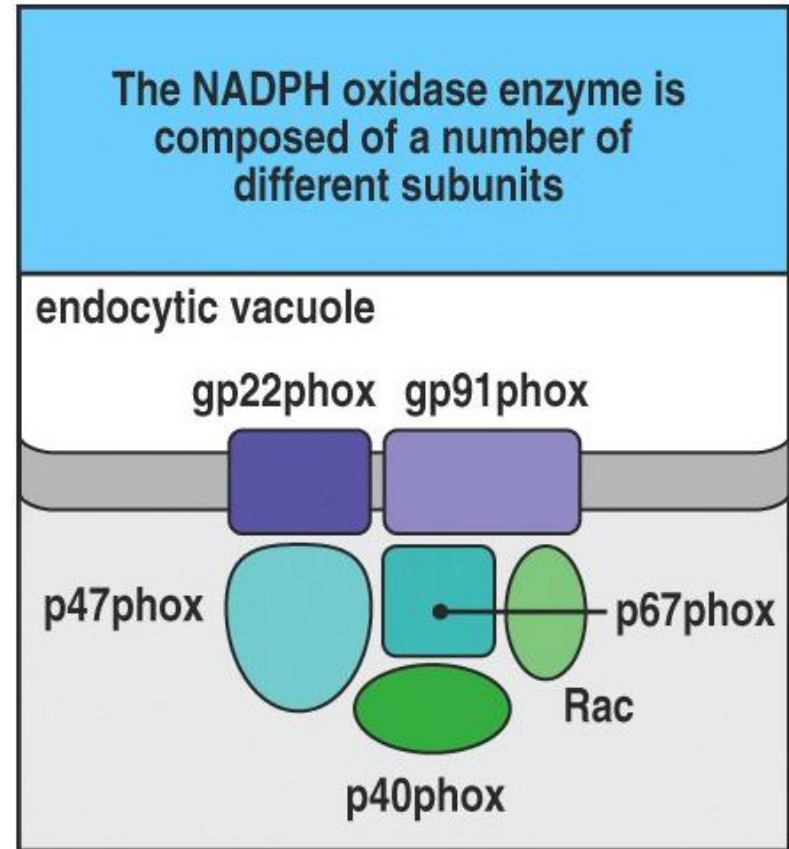
* La sintetasi inducibile dell'ossido nitrico che converte l'arginina in ossido nitrico dotato di attività microbica

Malattia granulomatosa cronica (CGD)

- infezioni ricorrenti e gravi da parte di batteri e miceti già dalla prima infanzia
- (*Stafilococco*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia*, *Aspergillo*, *Nocardia*)
- Profilassi antibiotica (TMP-SMX) e anti-fungina (itraconazolo) + in casi rari IFN-gamma

Malattia granulomatosa cronica (CGD):

- malattia genetica molto rara.
- 2/3 meccanismo di trasmissione legato a X, le altre forme autosomiche recessive
- Risposte cellulo-mediate croniche
- Normalmente deficit di gp91 phox= citocromo b₅₅₈



MALATTIA GRANULOMATOSA CRONICA

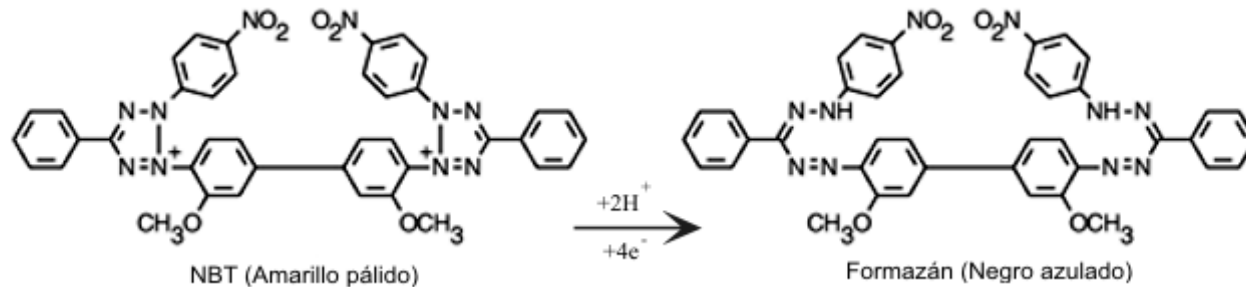
LOCALIZZAZIONE DEI PROCESSI INFETTIVI NELLA MALATTIA GRANULOMATOSA CRONICA

Molto frequenti (>60%)	Frequenti (20-60%)	Sporadiche (<20%)
Polmoni Linfonodi Cute	Orecchio medio Sistema osseo Regione perirettale Sistemica (setticemia)	Seni paranasali Apparato urinario Sistema nervoso centrale e meningi Pericardio

(Modificata da Curnutte JT, *Clin Immunol Immunopathol* 67, 3, s2, 1993)

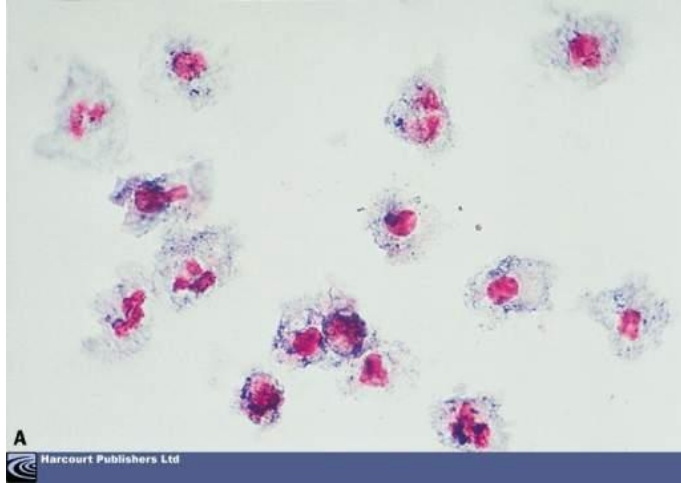
Diagnosi con test NBT

Il nitroblue di tetrazolio (NBT) è ridotto dai neutrofili normali, che mostrano depositi blue-viola.

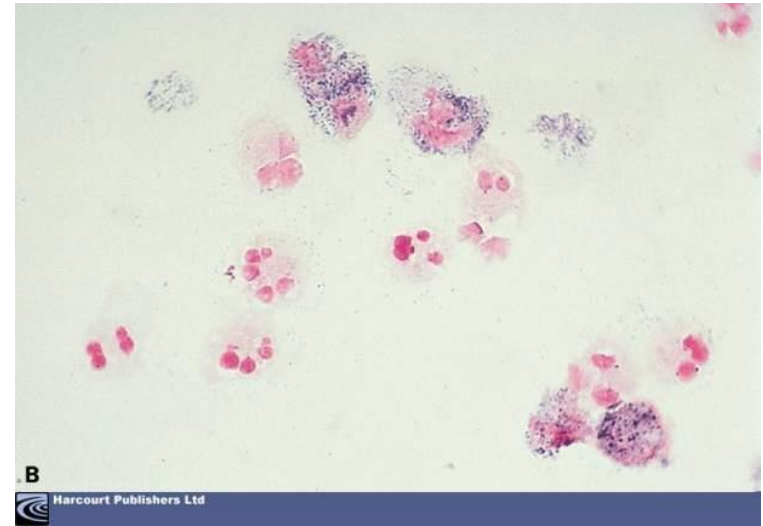


È un esame di screening qualitativo e semiquantitativo. In presenza di superossido l'NBT, giallo e solubile, viene ridotto a formazano, reagente blu scuro e insolubile che precipita nelle cellule.

Il nitroblue di tetrazolio (NBT) è ridotto dai neutrofili normali, che mostrano depositi blue-viola.



NBT test in un portatore di CGD: solo metà dei neutrofili riducono il NBT, mostrando granuli blue-viola



NBT test in un paziente affetto da CGD: i neutrofili non riducono il NBT: assenza dei granuli granuli blue-viola