

1. Immunità Innata, Infiammazione e Complemento

- Quali sono i principali **recettori dell'immunità innata (PRRs)** e quali funzioni svolgono? I recettori dell'immunità innata sono recettori capaci di riconoscere pattern generici presenti sulla superficie di patogeni o di tossine da essi prodotti o riscontrabili in seguito ad un danno cellulare, denominati rispettivamente PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) e DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns). Il legame tra PRR e questi profili molecolari scatena la risposta effettrice da parte delle cellule dell'immunità innata. Possiamo trovare i PRR:
 - a. **membrana cellulare:** nei quali possiamo distinguere recettori di membrana opsonici, associati a motivi intracitoplasmatici attivatori (ITAM) e motivi intracitoplasmatici inibitori (ITIM), e non opsonici.
 - b. **Citosol:** recettori disciolti all'interno del citosol capaci di riconoscere PAMPs e DAMPs come RLR, NLR, dectina, sensori di DNA citoplasmatico (CDS).
 - c. **membrana endosomiale:** come alcuni TLR.

A scopi didattici i recettori possono essere suddivisi in:

- d. **Recettori Solubili:** riconoscono i PAMPs sulla superficie del patogeno, segnalandolo in modo da potenziare il riconoscimento dei fagociti. Ne fanno parte alcune proteine di fase acuta come MBL, PCR, LBP, ma anche i NLR e RLR. Sono in grado di riconoscere DNA virale e attivano la via di trasduzione STING, che attiva cGAS che forma cGAMP il quale lega la proteina STING. STING attiva TBK1 che attiva IRF3 che porta alla produzione di interferone di primo tipo.
- e. **Recettori Fagocitici:** riconoscono i PAMPs, mediano l'internalizzazione e la successiva formazione del fagolisosoma. Questi recettori possono essere suddivisi a loro volta in recettori **opsonici** (come i recettori Fc, che riconoscono il patogeno solo se rivestito da opsonine come anticorpi, proteine del complemento e PCR) e **non opsonici** (che riconoscono direttamente il profilo molecolare). I recettori non opsonici si trovano sulla superficie dei neutrofili, delle DC, ecc., e ne fanno parte i recettori scavenger (come MARCO, il quale riconosce profili molecolari associati ai batteri), recettori per il mannosio e i recettori del complemento (CR1, CR3, CR4).
- f. **Recettori di Segnale:** riconoscono particolari profili molecolari ed attivano gli eventi di trasmissione del segnale attraverso proteine chinasiche. I TLR di membrana cellulare ed endosomiale sono in grado di scatenare due tipi di vie di trasduzione del segnale:
 - i. **MyD88 dipendente** (antivirale e antibatterica): i TLR presentano motivi TIR i quali attivano NF- κ B che trasloca nel nucleo per attivare la produzione di citochine pro-infiammatorie, chemochine e molecole stimolatorie.
 - ii. **MyD88 indipendente** (antivirale): TRIF attiva IRF che attiva la trascrizione genica per interferone-1.

Tra i recettori più importanti da citare troviamo:

- g. TLR9 (endosomiale)
- h. TLR1, 2, 4, 5, 6 (m. cellulare): riconoscono diverse componenti batteriche.

- i. **NLR:** presentano alcuni domini C-terminali, un dominio centrale chiamato NOD, domini N-terminali per reclutare proteine adattatrici, dominio CARD per richiamare caspasi, dominio attivante per trascrivere molecole MHC. I NLR sono coinvolti nel meccanismo indotto del signalosoma per la produzione di molecole MHC attraverso proteine chinasi come RIP-2 che stimola NF- κ B per produrre citochine e MHC come NLRC4, NLR-5 e NLRA. Inoltre alcuni NLR come NLRP3 inducono autofagia.
-

- Descrivi il processo della **fagocitosi**: quali cellule ne sono responsabili (es. neutrofilii) e quali sono le fasi biochimiche e meccaniche specifiche?

Il processo di fagocitosi è un processo tipico di alcune cellule dell'immunità innata che ha come obiettivo finale l'uccisione e la degradazione di patogeni e la successiva esposizione di alcuni antigeni sulla superficie delle cellule fagocitiche al fine di far partire la risposta immunitaria adattativa. La fagocitosi è adoperata dalle cellule monocito macrofagiche, dai neutrofilii e dalle cellule dendritiche e segue degli step ben precisi:

- a. **Migrazione**
- b. **Riconoscimento:** i fagociti attraverso i recettori fagocitici come i recettori scavenger, i recettori FC opsonici e non.
- c. **Internalizzazione:** il patogeno viene inglobato all'interno della membrana con la formazione di un fagosoma tardivo (il quale esprime marker rab5). Una volta formata l'invaginazione il fagosoma deve fondersi con il lisosoma e per far avvenire ciò sono necessari dei requisiti come l'acidificazione del pH, il trasporto di ferro all'interno del fagosoma e la rimozione della proteina TACO la quale impedisce la fusione con il lisosoma. La fusione del fagosoma con il lisosoma può avvenire in seguito alla fosforilazione di RAB14 da parte di AS160 (AKT riesce a inibire AS160).
- d. Avvenuta la fusione tra lisosoma e fagosoma si forma il fagolisosoma al cui interno avvengono dei processi di uccisione ossigeno dipendente ad opera di NADPH ossidasi, chiamato anche BURST Respiratorio, per produrre H₂O₂ e Ros (formata da subunità di membrana p22-phox e gp91-phox e tre subunità regolatorie come p40-phox, p47-phox e p67-phox, ossido nitrico dipendente ad opera di INOS e ossigeno indipendente attraverso enzimi proteolitici come lisozima, elastasi e catepsine, lattoferrina, mieloperossidasi, ceruloplasmina.

Tra le strategie di evasione dei patogeni abbiamo l'inibizione dell'acidificazione, il blocco della fusione fagosoma lisosoma e la persistenza intracellulare.

- Come avviene il **reclutamento e l'adesione leucocitaria**? Descrivi i passaggi, le molecole coinvolte e il difetto genetico alla base della LAD.

Il reclutamento e l'adesione leucocitaria è un processo fondamentale caratterizzato da 4 passaggi precisi e da un codice ben definito formato da selectine, integrine e chemochine.

L'evento 0, non legato strettamente al processo di reclutamento, riguarda le modifiche del flusso sanguigno e dei vasi.

1. **Rolling**: inizialmente attraverso una vasocostrizione e successiva vasodilatazione il flusso passa da laminare a turbolento permettendo un'interazione tra i leucociti e l'endotelio il quale in condizioni di infiammazione produce delle molecole denominate selectine, in particolare P ed E selectina che si legano a ligandi presenti sui leucociti come PSGL-1 e acidi di Lewis; questo permette il rolling, ovvero il rotolamento dei leucociti attraverso la formazione e rottura di questi legami deboli.

2. **Attivazione delle integrine** intracitoplasmatiche da parte delle chemochine e mediato da talina/kindlina. Le integrine attivate permettono la modificazione del citoscheletro causando un appiattimento dei leucociti.

3. **Adesione ferma** attraverso il legame di ICAM-1 e V-CAM 1.

4. **Diapedesi** che può avvenire in maniera paracellulare o transcellulare secondo gradiente chemotattico (chemochina **CXCL8** per neutrofilo e **CCL2**).

LAD, ovvero deficit di adesione leucocitaria, sono delle patologie a base genetica che causano immunocompromissione poiché i leucociti non sono in grado di aderire alla parete del vaso. In base al tipo di mutazione si dividono in:

LAD 1: deficit di integrina e mancanza di subunità beta 2 (CD18);

LAD 2: mancata presenza di acidi di Lewis;

LAD 3: mutazione e mancanza kindlina e mancata attivazione integrine.

- Descrivi il **sistema del complemento**: illustra nel dettaglio la via classica e la via lectinica di attivazione, elencando tutte le proteine coinvolte fino alla formazione del complesso MAC.

Il sistema del complemento è una cascata enzimatica dell'immunità innata costituito da 50 proteine inattive ed attivabili. Via classica e via lectinica sono due delle tre vie d'innescamento; differiscono nella fase di riconoscimento, ma convergono rapidamente sulla stessa identica **C3 convertasi**.

- a. **La Via Classica** è attivata dall'immunità adattativa: il complesso **C1** (C1q, due C1r, due C1s) riconosce la porzione Fc di anticorpi (IgM o almeno due IgG) legati all'antigene. C1q si attiva, attiva le serin-proteasi C1r, che a loro volta attivano **C1s**.
- b. **La Via Lectinica** è totalmente indipendente dagli anticorpi: si attiva quando la **MBL** (*Mannose-Binding Lectin*) o le **ficoline** riconoscono i residui di mannosio sulla superficie del patogeno. Questo legame attiva le proteasi associate, in particolare **MASP-2** (coadiuvata da MASP-1).

2. Formazione delle Convertasi (Il punto di convergenza)

Da questo momento in poi, l'attività enzimatica di **C1s** (nella classica) e di **MASP-2** (nella lectinica) è biologicamente identica:

- c. 1. Tagliano il fattore **C4** in C4a (rilasciato) e **C4b**, che si ancora alla membrana.
- d. 2. In presenza di magnesio, legano il fattore **C2** e lo tagliano in C2b e **C2a**.
- e. 3. Si forma così il complesso **C4b2a**, ovvero la **C3 convertasi** comune a entrambe le vie.

La C3 convertasi taglia massivamente il fattore C3: rilascia l'anafilotossina C3a e genera **C3b**. Una molecola di C3b si lega al complesso originario formando il trimero **C4b2a3b**, che costituisce la **C5 convertasi**.

3. La Via Terminale e il MAC

La C5 convertasi scinde **C5** in C5a (potente chemioattrattante) e **C5b**, che dà inizio all'assemblaggio del **MAC** (*Membrane Attack Complex*). Questa fase finale è puramente strutturale e non richiede più tagli proteolitici:

- f. 1. **C5b** si lega a **C6** e successivamente a **C7**. Il complesso intermedio C5b67 espone una regione idrofobica e si inserisce nel doppio strato lipidico della membrana.
- g. 2. Si unisce **C8**, che penetra più in profondità nella membrana.
- h. 3. Il complesso C5b-8 fa da catalizzatore per la polimerizzazione di **10-19 molecole di C9**.

Le proteine C9 si dispongono ad anello formando un poro cilindrico transmembrana (**C5b6789_n**). Questo canale distrugge l'integrità della membrana, causando un flusso incontrollato di acqua e ioni che porta alla **lisi osmotica** della cellula bersaglio.

2. Presentazione dell'Antigene e Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC)

- Come si classificano le cellule dendritiche? Qual è la differenza funzionale tra una dendritica matura e una immatura, specialmente riguardo al mantenimento della tolleranza?

Le cellule dendritiche rappresentano il principale ponte tra l'immunità innata e l'immunità adattativa. Possono essere classificate in sottopopolazioni distinte per ontogenesi e specializzazione funzionale:

- a. **Cellule Dendritiche Classiche o Convenzionali (cDC)**: si dividono ulteriormente in **cDC1** (altamente specializzate nella cross-presentazione e nell'attivazione dei linfociti **T CD8+**) e **cDC2** (efficaci nella presentazione **MHC di classe II** e nell'attivazione dei linfociti **T CD4+** helper, in particolare **Th2** e **Th17**).
- b. **Cellule Dendritiche Plasmacitoidi (pDC)**: caratterizzate dalla capacità di produrre massive quantità di **Interferon di tipo I (IFN- α e IFN- β)** in risposta a infezioni virali, attivando i meccanismi antivirali sistemici.
- c. **Cellule Dendritiche Derivate dai Monociti (moDC)**: popolazione che si differenzia a livello periferico a partire dai monociti infiammatori solo in condizioni di flogosi acuta o infezione.

Il profilo funzionale delle cellule dendritiche è strettamente legato al loro stato di maturazione, che determina il destino della risposta immunitaria (attivazione vs tolleranza):

- d. **Cellule Dendritiche Immature:** risiedono nei tessuti periferici e possiedono un'elevata capacità endocitica e fagocitica. Esprimono bassi livelli di molecole **MHC** sulla membrana plasmatica (trattenute prevalentemente nei compartimenti endosomiali) e livelli minimi di molecole di costimolazione (**CD80, CD86**).
- e. **Cellule Dendritiche Mature:** l'incontro con **PAMPs** o **DAMPs** e il legame con i **PRR** (es. **Toll-Like Receptors**) innesca il processo di maturazione. La cellula perde la capacità fagocitica, up-regola stabilmente i complessi peptide-MHC sulla membrana e incrementa l'espressione delle molecole costimolatorie (**CD80, CD86, CD40**). Inoltre, esprime il recettore per le chemochine **CCR7**, che ne guida la migrazione verso le aree T dei linfonodi drenanti.

Mantenimento della Tolleranza Periferica: in condizioni fisiologiche, le DC catturano costantemente antigeni *self* o innocui. In assenza di stimoli infiammatori, queste DC rimangono immature; presentando il peptide *self* sull'MHC ma mancando del secondo segnale (costimolazione **CD80/CD86**), inducono nei linfociti T autoreattivi uno stato di **anergia clonale**, ne provocano la **delezione per apoptosi** o favoriscono il differenziamento in **linfociti T regolatori (Treg)**.

- Descrivi il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC): qual è il suo locus genico, come è strutturato e quali cellule esprimono (o non esprimono) l'MHC di classe I?

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità è un sistema poligenico e polimorfo che codifica per glicoproteine di membrana deputate alla presentazione dell'antigene.

Nell'uomo, il sistema MHC prende il nome di **HLA (Human Leukocyte Antigen)** ed è mappato sul braccio corto del **cromosoma 6 (6p21.3)**. Si articola in tre regioni principali:

- a. **Classe I:** comprende i tre loci classici polimorfi HLA-A, HLA-B, HLA-C.
- b. **Classe II:** comprende i loci HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, ciascuno codificante per catene alpha e beta.
- c. **Classe III:** contiene geni non polimorfi coinvolti nella risposta immunitaria, come fattori del complemento (C2, C4) e citochine.
- d. **MHC di Classe I:** è costituito da una **catena pesante alpha** transmembrana associata in modo non covalente alla **beta2-microglobulina**. La tasca di legame del peptide è strutturalmente **chiusa** alle estremità.
- e. **MHC di Classe II:** è un eterodimero composto da una **catena alpha** e una **catena beta** transmembrana. La tasca di legame presenta un'estremità **aperta**.

Le molecole MHC di classe I sono espresse su tutte le cellule nucleate. Le cellule che **NON le esprimono** (o ne minimizzano l'espressione) includono:

- f. **Globuli rossi (eritrociti):** privi di nucleo.
 - g. **Cellule del trofoblasto villosa:** per prevenire il rigetto del feto.
 - h. **Neuroni del SNC e cellule germinali:** presentano livelli minimi di espressione.
- Quali sono le caratteristiche fisiche dei peptidi legati all'MHC (lunghezza e ruolo dei residui ancora)?

L'interazione tra il peptide antigenico e la tasca dell'MHC è stabilizzata da legami non covalenti (idrogeno, interazioni idrofobiche) ed è governata da vincoli sterici precisi dovuti alla conformazione della tasca stessa:

- a. **Nei complessi MHC di Classe I:** Poiché la tasca è chiusa, la lunghezza del peptide è rigidamente limitata a **8-11 aminoacidi**. I **residui ancora** sono localizzati strettamente alle **estremità del peptide** (tipicamente il secondo residuo all'N-terminale e l'ultimo residuo al C-terminale). Se un peptide è leggermente più lungo del dovuto, si flette verso l'alto al centro (effetto *bulge* o "a ponte") per accomodarsi nella fessura pur mantenendo saldi i residui ancora alle estremità.
 - b. **Nei complessi MHC di Classe II:** Poiché le estremità della fessura sono aperte, la lunghezza dei peptidi estratti è maggiore e più variabile, solitamente compresa tra **10 e 30 aminoacidi**, sebbene il core geometrico che risiede stabilmente nella tasca sia composto da circa 9 aminoacidi. I **residui ancora** non sono confinati alle estremità, ma sono distribuiti **lungo l'intera sequenza centrale** del peptide, inserendosi in specifiche tasche idrofobiche o idrofile poste sul pavimento della fessura dell'MHC. Il peptide assume una conformazione estesa e lineare, sporgendo al di fuori dei margini della molecola.
- Confronta i meccanismi di processazione dell'antigene: descrivi nel dettaglio la via citosolica (endogena) e la via vescicolare (esogena).

La processazione dell'antigene descrive la degradazione delle proteine in peptidi idonei al caricamento sulle molecole MHC. Si distinguono due vie intracellulari nettamente separate:

1. **La Via Citosolica (Endogena)** - Destinata all'MHC di Classe I. Questa via elabora proteine originate all'interno del citosol cellulare (es. proteine virali, antigeni tumorali o proteine self mal ripiegate):
 - a. **Degradazione:** Le proteine citosoliche vengono marcate con catene di ubiquitina e indirizzate al **proteasoma 26S** (o immunoproteasoma in infiammazione), che genera peptidi adatti all'MHC I.
 - b. **Trasporto:** I peptidi vengono traslocati nel lume del Reticolo Endoplasmatico (RE) tramite il trasportatore **TAP** (eterodimero ATP-dipendente).
 - c. **Assemblaggio (PLC):** Nel RE, la catena pesante alpha neosintetizzata si associa a chaperoni (calnessina, poi calreticulina ed ERp57) e alla beta2-microglobulina formando il **Complesso di Caricamento del Peptide (PLC)**. La **tapasina** funge da ponte avvicinando l'MHC I al TAP.
 - d. **Espressione:** Dopo eventuali tagli da parte di **ERAP**, il legame di un peptide affine stabilizza l'MHC I, che viaggia verso la membrana per il riconoscimento da parte dei linfociti T CD8+.
2. **La Via Vescicolare (Esogena)** - Destinata all'MHC di Classe II. Questa via elabora antigeni extracellulari catturati dalle APC:
 - a. **Proteolisi:** L'antigene esogeno viene internalizzato e degradato in endolisosomi acidi da proteasi chiamate **cathepsine**.
 - b. **Sintesi e Catena Invariante:** Nel RE, le catene alpha e beta dell'MHC II si assemblano con la **catena invariante (Ii)**. Questa ostruisce la tasca di legame e indirizza l'MHC verso la via endosomiale.
 - c. **Formazione del CLIP:** L'MHC II raggiunge il compartimento **MIIC**. Qui la catena invariante viene degradata lasciando solo un frammento nella tasca, il **CLIP**.

- d. **Scambio mediato da HLA-DM:** La molecola **HLA-DM** favorisce la rimozione del CLIP e il caricamento di un peptide esogeno ad alta affinità. Il complesso viaggia poi verso la superficie per i linfociti T CD4+.
- Come avviene la presentazione degli antigeni lipidici e cos'è la cross-presentazione?

Sebbene la maggior parte delle risposte T sia diretta contro peptidi, il sistema immunitario riconosce anche antigeni lipidici e glicolipidici (es. micolato di trealosio batterico). Questo processo avviene grazie alla famiglia di molecole **CD1**.

Le molecole CD1 sono strutturalmente simili alle molecole MHC di classe I, ma la loro fessura di legame è profonda, stretta e rivestita da **residui aminoacidici fortemente idrofobici**. Questo permette di accogliere le code aciliche dei lipidi, mentre la **testa polare del glicolipide rimane esposta** per il legame con il TCR.

La Cross-Presentazione

La **cross-presentazione** è un'eccezione fisiologica in cui un'APC professionale — specificamente la cellula dendritica classica di tipo 1 (**cDC1**) — cattura un antigene **esogeno** e lo devia all'interno della **via MHC di classe I**, presentandolo ai **linfociti T CD8+**. Questo fenomeno (*cross-priming*) è vitale perché:

Questo fenomeno (*cross-priming*) è vitale perché:

- e. Permette l'attivazione di linfociti T CD8+ citotossici contro virus che non infettano direttamente le cellule dendritiche.
- f. Consente alle DC di presentare antigeni tumorali per innescare l'immunità protettiva anti-neoplastica.

-
- Cosa sono le molecole **MIC-A** e **MIC-B** e qual è la loro funzione?

Le molecole MICA e MICB (*MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A e B*) sono glicoproteine di membrana correlate strutturalmente alle molecole MHC di classe I, ma con caratteristiche e funzioni biologiche distinte.

Pur avendo un'omologia strutturale con le MHC-I (condividono i domini extracellulari $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), presentano differenze cruciali:

Non legano la $\beta 2$ -microglobulina.

Non presentano peptidi (la tasca è chiusa o non adatta al legame).

Il loro polimorfismo influisce sull'affinità di legame con il recettore, non sulla presentazione antigenica.

A differenza delle MHC-I espresse costitutivamente, MICA e MICB sono **poco o nulla espresse nei tessuti sani**. La loro trascrizione è indotta massicciamente da **stress cellulare: infezioni virali o batteriche** intracellulari, **Trasformazione neoplastica** (danno al DNA o attivazione di oncogeni), **Shock termico** (grazie ad elementi di risposta *HSE*), **Stress ossidativo** o danno tissutale.

Funzionano come "allarmi" molecolari che segnalano al sistema immunitario che una cellula è alterata. MICA e MICB sono i leganti del recettore attivatorio **NKG2D**,

espresso su: **Cellule NK** (*Natural Killer*), **Linfociti T CD8+** (citotossici), **Linfociti T $\gamma\delta$** .

Meccanismo d'Azione:

Il legame NKG2D-MICA/MICB trasduce un **potente segnale attivatorio**:

Nelle cellule NK, supera i segnali inibitori (dati da MHC-I) e induce la **degranulazione** (perforine e granzimi), portando alla citolisi.

Nei linfociti T CD8+, funge da segnale di co-stimolazione, potenziando l'attività citotossica indipendentemente dal TCR.

Molti tumori attuano il **tumor escape** producendo metalloproteasi che tagliano la porzione extracellulare di MICA/MICB (**shedding**). Le molecole rilasciate in forma solubile si legano ai recettori NKG2D a distanza, causando l'internalizzazione e la down-regulation del recettore. Questo "acceca" le cellule NK, permettendo al tumore di sfuggire alla sorveglianza immunitaria.

3. Sviluppo e Tolleranza Linfocitaria

- Descrivi le fasi dell'**ontogenesi dei linfociti T**
 - a. **Ingresso nel timo:** il processo inizia quando il CLP (progenitore linfoide comune) entra nel timo, diventando ETP (Early Thymic Precursor). Sotto la spinta del segnale NOTCH-1, iniziano le ricombinazioni delle catene del TCR (alfa e beta) ad opera di RAG1 e RAG2.
 - b. **Stadio Doppio Negativo (DN):** il pro-linfocita non esprime né CD4 né CD8. Si suddivide in quattro sottofasi:
 - i. **DN1-DN2:** nello stadio DN2 avviene la biforcazione verso la linea dei linfociti T $\gamma\delta$.
 - ii. **DN3:** avviene la ricombinazione VDJ della catena Beta. Alla catena Beta neosintetizzata viene associata una catena alfa surrogata, formando il pre-TCR (Beta-selection).
 - iii. **DN4:** transizione verso lo stadio successivo.
 - c. **Stadio Doppio Positivo (DP):** grazie alla riattivazione dei complessi enzimatici, la catena alfa surrogata è sostituita dalla catena alfa definitiva. In questa fase vengono up-regolati sia CD4 che CD8.
 - d. **Processi di Selezione:**
 - i. **Selezione Positiva:** avviene nella corticale ad opera delle cTEC. I linfociti che riconoscono il complesso MHC-peptide sopravvivono. Il riconoscimento di MHC-II guida il differenziamento in CD4+, mentre MHC-I guida quello in CD8+.
 - ii. **Selezione Negativa (Tolleranza centrale):** avviene nella midollare ad opera delle mTEC che, grazie al gene AIRE, presentano antigeni tissutali periferici. Un'alta avidità di legame porta alla delezione clonale (apoptosi); un'avidità intermedia può indurre il differenziamento in Treg; un'avidità bassa permette il superamento della selezione.
-

- Descrivi le fasi dell'**ontogenesi dei linfociti B**

durante lo sviluppo embrionale, il fegato fetale rappresenta la sede principale (originando i linfociti B-1), mentre dopo il parto il processo si sposta stabilmente nel midollo osseo. Il cammino differenziativo muove dalla cellula staminale emopoietica (HSC) verso lo stadio di **progenitore linfoide comune (CLP)**. Nel microambiente midollare, il CLP interagisce con le cellule stromali ricevendo stimoli citochinici (come **IL-7**). L'espressione del fattore di trascrizione **PAX5** determina il commitment definitivo, inibendo i programmi genetici alternativi. Con la prima fase inizia la ricombinazione somatica **V(D)J** del locus per la catena pesante delle Ig, mediata dai complessi enzimatici **RAG1 e RAG2**. Il processo si articola in:

- g. **Pro-B precoce**: giunzione dei segmenti genici D e J.
- h. **Pro-B tardivo**: unione del segmento V al complesso preformato DJ.

La sintesi di una catena pesante funzionale segna l'ingresso nello stadio Pre-B. In mancanza di catene leggere definitive, la catena si associa alle **catene leggere surrogate** (VpreB e 5). Questo assemblaggio, unito alle molecole **Ig (CD79a)** e **Ig (CD79b)** dotate di motivi ITAM, costituisce il **Pre-BCR**.

Il segnale del Pre-BCR, trasmesso dalla chinasi **Btk**, assolve funzioni critiche:

- Assicura la sopravvivenza e stimola la **proliferazione clonale** (Pre-B grandi).
- Induce l'**esclusione allelica** silenziando i geni RAG1/2, garantendo l'espressione di una singola specificità per ogni linfocita.
- Avvia il riarrangiamento genico della catena leggera.

Dopo la fase espansiva (Pre-B piccole), le ricombinasi tornano attive per processare i locus e formare la catena leggera definitiva

L'espressione superficiale delle **IgM** complete definisce il linfocita B immaturo, il quale viene sottoposto a **selezione negativa** nel midollo. Qui il BCR viene testato contro molecole self; a differenza dei T, non interviene la restrizione MHC.

In caso di alta avidità per il self, la cellula può ricorrere all'**editing recettoriale**: la riattivazione di RAG permette nuovi riarrangiamenti della catena leggera per modificare la specificità. Il fallimento di questo recupero conduce alla **delezione clonale** via apoptosi.

Le cellule superstiti lasciano il midollo come **linfociti transizionali**, migrando verso la milza. In periferia, i segnali del recettore **BAFF** completano il differenziamento.

L'ultimo step molecolare prevede lo splicing alternativo che permette la co-espressione di **IgM e IgD** con identica specificità. Il **linfocita B naive maturo** esprime infine il complesso corecettoriale (**CD19, CD21, CD81**).

1. Tolleranza Centrale: Selezione Positiva e Negativa (Timo e Midollo Osseo)

La tolleranza centrale è il processo primario e fondamentale per evitare che il vastissimo e casuale repertorio recettoriale dei linfociti attacchi i costituenti tissutali dell'organismo (autoimmunità). Negli organi linfoidi primari, i linfociti immaturi che legano gli antigeni self con un'alta e pericolosa affinità vengono perentoriamente eliminati per apoptosi o riprogrammati.

Ontogenesi e Selezione nel Timo (Linfociti T): I processi di selezione si basano sulla fine valutazione dell'affinità di legame tra il neo-recettore TCR dei timociti e i complessi peptide self-MHC presentati capillarmente dalle cellule stromali timiche.

- **Selezione Positiva (Corticale):** È mediata a livello della corticale dalle cellule epiteliali corticali (cTEC). I timociti allo stadio "doppio positivo" (CD4+ CD8+) mettono fisicamente alla prova il proprio TCR. Se il TCR riconosce il complesso autologo self-peptide-MHC con un'affinità bassa o moderata, riceve un segnale salvifico di sopravvivenza (la cosiddetta "educazione timica"); in assenza di alcun legame utile, la cellula subisce inesorabilmente la morte per deprivazione (death by neglect). In questa sede si stabilisce un cardine vitale, la restrizione MHC: se il timocita riconosce complessi MHC di classe I spegnerà il CD4 per diventare un linfocita CD8+ (singolo positivo), se riconosce MHC di classe II diventerà un CD4+.
- **Selezione Negativa (Midollare):** Avviene nella giunzione cortico-midollare e nella midollare del timo, ad opera delle cellule epiteliali midollari (mTEC) e delle cellule dendritiche residenti. Il suo scopo assoluto è la delezione clonale dei cloni altamente autoreattivi: se il TCR lega il complesso self-peptide-MHC con un'affinità ed un'avidità eccessiva, la cellula viene immediatamente indotta all'apoptosi tramite le vie biochimiche intrinseche (es. proteine pro-apoptotiche Bim, Bax/Bak) o tramite l'interazione dei recettori di morte Fas-FasL.

Tolleranza Centrale nel Midollo Osseo (Linfociti B): A differenza dei linfociti T, in cui il riconoscimento forte del self innesca di norma direttamente l'apoptosi, i linfociti B immaturi midollari (IgM+) che legano antigeni midollari godono di un sofisticato meccanismo genetico di "seconda chance", noto come **editing recettoriale**. Riconosciuta l'autoreattività patologica, il recettore del linfocita B arresta transitoriamente i segnali apoptotici, riattiva gli enzimi RAG (ricombinasi) e tenta ripetutamente e stocasticamente un nuovo riarrangiamento genico a carico del locus della catena leggera (ad esempio passando dall'isotipo κ a λ). Questa alterazione muta profondamente l'idiotipo e l'affinità del BCR; se il nuovo recettore "corretto" non è più autoreattivo, la cellula sopravvive ed entra in circolo periferico. Se invece il clone fallisce ripetutamente le correzioni, la selezione negativa e l'apoptosi divengono irreversibili.

2. Il ruolo del gene AIRE e del recettore RANK

Durante la selezione negativa midollare, è imperativo vagliare i linfociti T contro auto-antigeni tipici di organi anatomicamente lontani (es. insulina pancreatica, proteine retiniche o tireoglobulina). Questo traguardo biologico è garantito dalla proteina nucleare AIRE (Autoimmune Regulator). L'espressione di AIRE a livello delle mTEC forza in modo esclusivo la trascrizione ectopica e promiscua di centinaia di antigeni tessuto-specifici, presentandone i relativi peptidi ai linfociti in fase di selezione per valutarne la reattività. Difetti genici mendeliani a carico di AIRE causano una catastrofica elusione della tolleranza centrale, scatenando la gravissima sindrome autoimmune poliendocrina sistemica di tipo 1 (APS-1/APECED). Da un punto di vista del differenziamento tissutale, la maturazione completa delle cellule epiteliali mTEC e l'induzione stessa del promotore di AIRE dipendono strettamente dal segnale biochimico mediato dal recettore RANK espresso sull'epitelio. L'attivazione di RANK avviene in seguito all'interazione fisica essenziale con il suo specifico

ligando, il RANKL, esibito fisiologicamente dalle cellule LTi (Lymphoid Tissue Inducer) o dagli stessi timociti maturanti in loco.

3. Meccanismi della Tolleranza Periferica

Se alcuni linfociti autoreattivi riescono a fuggire dal timo o dal midollo, l'organismo demanda il controllo di sicurezza agli organi linfoidi secondari e ai tessuti attraverso i rigorosi meccanismi della tolleranza periferica:

- **Anergia Clonale:** È uno stato di profonda inattivazione funzionale irreversibile. Si instaura qualora il linfocita T naïve intercetti il suo antigene self (Segnale 1) in un microambiente non infiammato, situazione che porta alla drastica assenza del segnale di co-stimolazione da parte delle APC (Segnale 2, ovvero il legame CD28-B7). Tale squilibrio attiva enzimi cellulari (ubiquitina-ligasi come Cbl-b) che degradano perennemente le molecole di segnalazione a valle del TCR, bloccando alla radice ogni capacità proliferativa o produzione di IL-2.
- **Morte Cellulare Indotta dall'Attivazione (AICD):** Stimolazioni violente, ripetute e massive derivanti da abbondanti autoantigeni periferici inducono lo spegnimento cellulare. L'assenza di co-stimolazione sbilancia l'assetto intracellulare attivando le proteine pro-apoptotiche della famiglia BH3-only (come Bim) ed innescando la via mitocondriale intrinseca. Contemporaneamente, l'iperattivazione prolungata spinge i cloni T a sovraesprimere i recettori di morte Fas e FasL, portando all'apoptosi mediata dalla via estrinseca.
- **Ignoranza Clonale:** I linfociti autoreattivi non innescano alcuna patologia in quanto l'antigene self bersaglio è in concentrazione talmente minimale da non raggiungere l'attivazione della soglia recettoriale.
- **Siti Immunologicamente Privilegiati:** Strutture tissutali delicate e non rigenerabili (cervello, testicoli, occhio, placenta) mettono in atto barriere chimiche formidabili, esprimendo alti livelli di recettori di morte come FasL per disintegrare le cellule T infiltranti, rilasciando enzimi inibitori o bloccando il complemento per proteggersi da danni infiammatori (sequestro antigenico).
- **Esclusione Follicolare (Linfociti B):** I linfociti B auto-reattivi disattivano selettivamente l'espressione del loro recettore chemochinico di homing, il CXCR5. Privati di questo tracciante, è precluso loro l'ingresso nei follicoli linfoidi. Non potendo incontrare le fondamentali cellule T-helper follicolari (Tfh) e non ricevendo i relativi fattori citochinici di sopravvivenza, le cellule B periscono rapidamente.

4. Linfociti T Regolatori (Treg)

Il comparto regolatorio modula attivamente e spegne le risposte immunitarie sregolate o le reazioni autoimmuni periferiche.

- **Sviluppo e Origine:** La frazione più formidabile è costituita dai **Treg Naturali (nTreg)**, i quali originano tipicamente eludendo la delezione: i cloni CD4+ che reagiscono al self con una "finestra d'affinità" sub-pericolosa o intermedia-alta deviano il loro destino biologico convertendosi alla soppressione protettiva. Esiste inoltre una vastissima famiglia di **Treg Indotti Periferici (iTreg)**, che nascono in periferia a partire da T CD4+ naïve quando si attivano in un microambiente intensamente tollerogenico (es. la mucosa intestinale), generando sotto-fenotipi come Tr1 (secerne IL-10) o Th3 (secerne TGF-β).
- **Marcatori Fenotipici:** La conformazione immunofenotipica classica per riconoscere e isolare un clone Treg naturale si basa su altissimi livelli del recettore per l'IL-2 combinati ad un'espressione specifica: **CD4+ CD25++ FoxP3+ CD127-**. L'evento dirimente è la profonda sintesi del fattore di trascrizione master *FoxP3*, il cui ruolo è

inestimabile per cementare l'identità soppressoria (una sua mutazione causa la drammatica patologia IPEX).

- **Meccanismi Soppressori:**
 - **Secrezione di citochine inibitorie:** Riversano IL-10 (potente immunosoppressore che annulla l'espressione di MHC e molecole costimolatorie sulle APC) e massicce quote di TGF- β (che impone il blocco della proliferazione ai cloni T limitrofi).
 - **Consumo (Deprivazione) metabolico di IL-2:** Esprimendo costitutivamente dosi massimali della catena α del recettore per IL-2 (il recettore trimetrico ad alta affinità CD25), i Treg si comportano come "spugne biochimiche", sequestrando rapidamente dal microambiente vitale l'IL-2 secreta e affamando inesorabilmente i linfociti T effettori circostanti per portarli a morte da deprivazione.
 - **Deplezione co-stimolatoria tramite CTLA-4:** Sfruttando la sproorzionata affinità del loro recettore CTLA-4, legano le molecole B7-1 e B7-2 sulle APC. Mediante un geniale processo di *trogocitosi* endocitano fisicamente i ligandi estratti dalle dendritiche, silenziando alla base l'interazione CD28 e bloccando sul nascere l'attivazione di linfociti collaterali naïve (assenza di Segnale 2).
 - **Lisi metabolica via Adenosina:** Sfruttano la funzione catalitica dei loro ectoenzimi di membrana (CD39 e CD73) per degradare e idrolizzare l'ATP extracellulare infiammatorio in *adenosina*, che funge da devastante mediatore depressivo paralizzando a cascata i linfociti attivati intercettati via recettore A2A.

5. Meccanismi di regolazione inibitoria mediati da CTLA-4 e PD-1

(Immunocheckpoints) Sia CTLA-4 che PD-1 costituiscono un gruppo d'élite di recettori detti immunocheckpoints, il cui ruolo fisiologico non è promuovere, bensì frenare l'attivazione linfocitaria imponendo l'anergia ed impedendo infiammazioni sistemiche fatali contro l'organismo intatto (come nella risoluzione ("contrazione") di un'infezione).

- **CTLA-4 (CD152):** È una glicoproteina recettoriale che esplica una feroce competizione antagonista ed a monte per lo spegnimento della costimolazione linfocitaria. Si lega agli stessi identici ligandi bersaglio del recettore attivatore CD28: ovvero i co-recettori B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) espressi dalle APC, ostentando tuttavia un'affinità di legame incommensurabilmente più potente. In condizioni fisiologiche basali (quando i patogeni sono esigui o assenti e domina il self), l'alta concentrazione di CTLA-4 sui linfociti (spesso costitutiva nei Treg o sovraregolata sui T reattivi dopo 3-4 giorni post-infezione) satura a tappeto il poco ligando B7 disattivando l'intero innesco del secondo segnale attivatorio, bloccando e spegnendo la risposta e l'espansione cellulare T.
- **PD-1 (CD279):** Appartenente a una differente asse recettoriale trasduttiva, il Programmed Death-1 è un ligando che una volta estroflesso dai linfociti T, B o NK attivati, decodifica ed incontra i suoi ligandi inibitori aspecifici e periferici: PD-L1 (CD274) o PD-L2 (CD273) esibiti diffusamente sulle cellule dendritiche, sui macrofagi e nei tessuti sani. La trasduzione generata dall'allaccio PD-1 a PD-L1 determina uno spegnimento funzionale violento (silenziamento per paralisi chinasi e paralisi della sopravvivenza) del linfocita. In campo neoplastico, l'asse PD-1 rappresenta la chiave biologica all'immuno-evasione: svitati cloni tumorali (o cellule infettate da virus persistenti) mascherano chirurgicamente la propria esistenza *iper-esprimendo subdolamente e artificialmente sui propri tessuti le molecole PD-L1 o PD-L2*; ciò

inganna i cloni T-citotossici infiltranti (TILs) provocandone l'anergia passiva. In medicina oncologica, molecole d'ingegneria anticorpale quali i farmaci *Ipilimumab* (anti-CTLA-4), *Nivolumab* e *Pembrolizumab* (anti-PD-1) sono ideati per ostruire ed inibire stericamente questo esatto gruppo di freni immunitari, sbloccando di forza un prepotente e rinnovato assalto reattivo immunitario endogeno per far regredire e disintegrare le masse metastatiche.

•

4. Immunità Adattativa Cellulo-Mediata (T, NK e ILC)

Benvenuto a questa sessione avanzata di immunologia e immunopatologia. Affronteremo in sequenza i pilastri molecolari e cellulari dell'attivazione e dell'effettore immunitario adattativo e innato, mantenendo il rigore analitico richiesto in un contesto d'esame magistrale.

1. I Subset dei Linfociti T CD4+ (Th1, Th2, Th17) e il ruolo dell'Interferone- γ

La specializzazione funzionale dei linfociti T CD4+ naïve (Th0) rappresenta il fulcro dell'orchestrazione della risposta immunitaria adattativa. Questo processo, noto come **polarizzazione clonale**, è dettato dal microambiente citochinico presente al momento del riconoscimento dell'antigene presentato dalle cellule dendritiche (APC).

Il subset Th1

- **Citochine Polarizzanti:** La differenziazione in Th1 è guidata principalmente dall'**IL-12** (prodotta da macrofagi e cellule dendritiche in risposta a virus e batteri intracellulari) e dall'**IFN- γ** stesso, che instaura un loop di retroazione positiva.
- **Fattore di Trascrizione Master:** L'attivazione recettoriale induce la fosforilazione di STAT4 (via IL-12) e STAT1 (via IFN- γ), culminando nell'espressione sovraregolata del master regulator **T-bet** (*T-box expressed in T cells*).
- **Citochine Effettrici:** I linfociti Th1 maturi secernono massicce dosi di **IFN- γ** e **IL-2**.
- **Funzione Principale:** Immunità protettiva contro **patogeni intracellulari** (virus, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania*).

Il Ruolo Specifico e Dettagliato dell'Interferone- γ (IFN- γ)

L'IFN- γ è una citochina pleiotropica di classe II (interferone di tipo II) che agisce come il più potente attivatore macrofagico. I suoi meccanismi biochimici includono:

1. **Attivazione Classica dei Macrofagi (M1):** L'IFN- γ stimola la trascrizione dell'enzima **iNOS** (ossido nitrico sintasi inducibile) e attiva i complessi della **NADPH ossidasi** fagocitica, inducendo la produzione massiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) nel fagosoma, essenziali per la digestione dei microbi endocellulari osmoticamente resistenti.
2. **Upregulation del Macchinario di Presentazione Antigenica:** Incrementa drasticamente l'espressione di molecole **MHC di classe I e classe II**, nonché dei trasportatori **TAP** e delle subunità del immunoproteasoma (LMP2/LMP7), potenziando l'efficienza con cui le cellule presentano gli epitopi ai linfociti T.
3. **Switch Isotipico B-cellulare:** Nei linfociti B, l'IFN- γ guida lo switch di classe verso sottoclassi anticorpali altamente opsonizzanti e capaci di fissare il complemento (come le **IgG1** e **IgG3** nell'uomo, equivalenti alle IgG2a nel topo).
4. **Inibizione Cross-Subset:** Esercita un blocco trascrizionale diretto sulla differenziazione verso le linee Th2 e Th17, stabilizzando l'asse Th1.

Il subset Th2

- **Citochine Polarizzanti:** Il differenziamento è interamente dipendente dall'**IL-4**,

spesso rilasciata precocemente da basofili, mastociti o cellule linfoide innate di tipo 2 (ILC2) in risposta ad allergeni o macroparassiti.

- **Fattore di Trascrizione Master:** La segnalazione passa attraverso STAT6, che induce l'espressione del fattore di trascrizione **GATA-3**. GATA-3 agisce rimodellando epigeneticamente il locus genico delle citochine Th2 mediante acetilazione istonica.
- **Citochine Effettrici:** Secernono **IL-4**, **IL-5** e **IL-13**.
- **Funzione Principale:** Difesa contro **parassiti extracellulari ed elminti**, oltre ad essere l'asse patogenetico centrale delle malattie allergiche da ipersensibilità di I tipo.

Il subset Th17

- **Citochine Polarizzanti:** Richiede la cooperazione sinergica di **IL-6** e **TGF- β** (coadiuvati nelle fasi tardive di stabilizzazione da **IL-1 β** e **IL-23**).
- **Fattore di Trascrizione Master:** La via biochimica è mediata da STAT3, che promuove l'espressione del recettore nucleare orfano **ROR γ t** (*RAR-related orphan receptor gamma t*).
- **Citochine Effettrici:** Producono **IL-17A**, **IL-17F** e **IL-22**.
- **Funzione Principale:** Reclutamento massivo di neutrofili per l'eliminazione di **batteri extracellulari e miceti** (es. *Candida albicans*), mantenendo l'integrità delle barriere mucosali. Un'iperattivazione del Th17 è legata a gravi patologie autoimmuni sistemiche (es. psoriasi, sclerosi multipla).

2. Ruolo dei Linfociti Th2 nell'Eliminazione Fisica dei Parassiti ed Elminti

Gli elminti sono parassiti troppo voluminosi per poter essere fagocitati dai macrofagi o dai neutrofili. Il sistema immunitario ha quindi evoluto una strategia cooperativa mediata dal subset Th2 che combina l'espulsione meccanica mucosale con l'attacco chimico citotossico tissutale. Questo meccanismo coordinato prende il nome clinico di **"Weep and Sweep" (Piangi e Spazza via)**.

1. Il Meccanismo Meccanico ("Weep and Sweep"):

- L'**IL-4** e l'**IL-13** agiscono direttamente sulle cellule staminali criptiche dell'epitelio intestinale, forzando il loro differenziamento verso la linea delle **cellule caliciformi mucipare** (Goblet cells). Questo determina un'iperproduzione di muco fluido che intrappola fisicamente il parassita, impedendone l'ancoraggio alla parete tissutale.
- In parallelo, IL-13 stimola la contrattilità della muscolatura liscia intestinale (iperperistalsi), accelerando l'espulsione meccanica dell'elminto così immobilizzato ("sweep").

2. Il Reclutamento e l'Attivazione degli Eosinofili:

- L'**IL-5** secreta dai Th2 è il fattore di crescita e chemiotattico più selettivo per gli eosinofili. Stimola il midollo osseo a produrli e ne guida l'extravasazione guidata nel sito di infestazione.

3. La Citotossicità Cellulare Antibody-Dipendente (ADCC):

- L'**IL-4** induce lo switch isotipico nei linfociti B per la produzione di **IgE**. Le IgE sistemiche e locali si legano specificamente agli antigeni di superficie dell'elminto.
- Gli eosinofili attivati esprimono sulla loro membrana il recettore ad alta affinità per le catene pesanti delle IgE, denominato **Fc ϵ RI** (nonché il recettore a bassa affinità Fc ϵ R2/CD23).
- Il legame multivalente (cross-linking) tra le IgE legate al parassita e i recettori

FcεRI degli eosinofili innesca una massiccia degranolazione esocitotica. Gli eosinofili riversano sulla cuticola del parassita proteine altamente tossiche contenute nei loro granuli specifici: la **Proteina Basica Maggiore (MBP)**, la **Proteina Cationica degli Eosinofili (ECP)** e la **Perossidasi degli Eosinofili (EPO)**. Queste molecole agiscono perforando e disintegrando il tegumento esterno dell'elminto, conducendolo alla necrosi.

3. Struttura della Sinapsi Immunologica e Funzionamento del Recettore dell'IL-2

La Sinapsi Immunologica (IS)

La sinapsi immunologica è un dominio di membrana altamente organizzato e dinamico che si forma all'interfaccia tra un linfocita T e una cellula APC (o cellula bersaglio). La sua architettura è disposta in tre anelli concentrici denominati **SMAC** (*Supramolecular Activation Clusters*):

- **c-SMAC (Central SMAC):** È il nucleo centrale della sinapsi. Contiene le molecole responsabili della trasduzione del segnale primario e co-stimolatorio: il **complesso TCR-CD3**, i corecettori **CD4** o **CD8**, e le molecole co-stimolatorie come **CD28** e **CTLA-4**. Al di sotto della membrana del c-SMAC si concentrano le tirosine chinasi (Lck, ZAP-70) e la PKC-θ.
- **p-SMAC (Peripheral SMAC):** È l'anello intermedio che funge da sigillo adesivo per stabilizzare l'interazione. È dominato dall'integrina **LFA-1** (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) espressa sul linfocita T, che si ancora saldamente al suo ligando **ICAM-1** (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) presente sulla APC. Contiene anche la proteina citoscheletrica talina, che connette le integrine ai filamenti di actina.
- **d-SMAC (Distal SMAC):** È l'anello più esterno. Svolge un ruolo regolatorio per segregazione sterica. Contiene molecole caratterizzate da ectodomini voluminosi e rigidi, come la fosfatasi **CD45** e la sialoglicoproteina **CD43**. A causa della loro dimensione molecolare, queste proteine vengono escluse fisicamente dal centro della sinapsi, permettendo alle membrane cellulari nel c-SMAC di avvicinarsi a una distanza critica (~15 nm) sufficiente per l'interazione TCR-MHC.

Il Recettore dell'Interleuchina-2 (IL-2R)

L'IL-2 è il principale fattore di crescita e sopravvivenza clonale dei linfociti T. Il suo recettore può esistere in tre diverse configurazioni strutturali che determinano differenti affinità di legame:

1. **Forma a Bassa Affinità :** Costituita esclusivamente dalla catena **α (CD25)**. Il CD25 da solo non possiede domini di segnalazione intracellulare; serve unicamente a catturare l'IL-2 a basse concentrazioni e a favorire il suo legame con le altre catene.
2. **Forma a Moderata Affinità :** Costituita dall'eterodimero formato dalla catena **β (CD122)** e dalla catena **γ comune gamma, CD132**. Questa forma è espressa costitutivamente sui linfociti T CD8+ memory e sulle cellule NK a riposo. È in grado di trasdurre il segnale biologico solo in presenza di elevate concentrazioni di IL-2.
3. **Forma ad Alta Affinità:** È il complesso eterotrimerico completo costituito da **CD25 (α) + CD122 (β) + CD132 gamma**. Questa forma viene assemblata *ex novo* sui linfociti T helper e citotossici solo in seguito all'attivazione mediata dal TCR (che induce la trascrizione di CD25). È invece espressa in modo costitutivo ed elevato sui **linfociti T regolatori (Treg)**.

Meccanismo di Segnalazione Intracellulare: Quando l'IL-2 si lega al trimero, induce il

ravvicinamento conformazionale dei domini citoplasmatici delle catene β e gamma. La catena β recluta costitutivamente la tirosina chinasi **JAK1**, mentre la catena gamma recluta la chinasi **JAK3**. La vicinanza spaziale permette il cross-autofosforilazione delle JAK, le quali creano siti di attracco per il fattore di trascrizione **STAT5**. STAT5 viene fosforilato, omodimerizza e trasloca nel nucleo per attivare i programmi genici di proliferazione cellulare (es. ciclina D) e di sopravvivenza (es. Bcl-2).

4. Cellule Natural Killer (NK): Recettori e Meccanismi di Citotossicità

Le cellule Natural Killer sono linfociti granulari grandi appartenenti al sistema immunitario innato (fenotipicamente definite come **CD56+ CD3-**). La loro funzione primaria è l'eliminazione di cellule neoplastiche o infettate da patogeni intracellulari che tentano di eludere i linfociti T citotossici.

I Recettori delle Cellule NK: Il Bilancio dei Segnali

L'attivazione delle NK non dipende da un singolo recettore clonale riarrangiato, bensì dall'integrazione biochimica dinamica e temporale di segnali derivanti da due classi di recettori di superficie. La decisione di risparmiare o uccidere una cellula bersaglio è descritta dall'ipotesi del "**Missing Self**" (**Mancanza del Self**).

1. Recettori Inibitori (Riconoscimento del Self sano)

Riconoscono le molecole MHC di classe I (HLA) espresse costitutivamente su tutte le cellule nucleate sane dell'organismo.

- **KIR (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors)**: Famiglia di recettori polimorfici che legano epitopi specifici delle molecole HLA classiche (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Strutturalmente si dividono in forme a coda lunga (es. KIR2DL, KIR3DL) che mediano l'inibizione.
- **CD94/NKG2A**: Un eterodimero recettoriale che riconosce selettivamente la molecola MHC non classica **HLA-E**. HLA-E presenta peptidi leader derivati dalla sintesi delle altre catene MHC-I, fungendo da barometro indiretto della corretta sintesi proteica del self.
- *Meccanismo Molecolare*: Le code citoplasmatiche di questi recettori contengono motivi corti denominati **ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs)**. Quando il recettore lega l'MHC-I, l'ITIM viene fosforilato e recluta la tirosina fosfatasi **SHP-1**. SHP-1 defosforila attivamente le molecole di segnalazione attivate a valle dei recettori stimolatori, bloccando sul nascere l'esocitosi dei granuli.

2. Recettori Attivatori (Riconoscimento del Self alterato)

Riconoscono ligandi espressi solo da cellule sotto stress metabolico, infettate o trasformate.

- **NKG2D**: Un omodimerico essenziale che riconosce le molecole **MICA**, **MICB** e le proteine **ULBP (UL16-binding proteins)**. Questi ligandi non sono espressi nei tessuti sani, ma vengono trascritti massicciamente in risposta al danno al DNA o alla trasformazione neoplastica.
- **NCR (Natural Cytotoxicity Receptors)**: Includono **NKp30**, **NKp44** e **NKp46**. Legano molecole virali (come l'emoagglutinina influenzale) o ligandi tumorali espressi sulla membrana bersaglio.
- **CD16 (Fc γ RIIIa)**: Recettore a bassa affinità per la regione costante Fc delle IgG. Permette alle NK di legarsi a cellule opsonizzate da anticorpi, esplicando la **ADCC** (Citotossicità cellulare antibody-dipendente), un meccanismo analogo a quello descritto per gli eosinofili ma rivolto a cellule target tumorali o virali.
- *Meccanismo Molecolare*: I recettori attivatori si associano a catene adattatrici transmembrana (come DAP12, CD3 ζ o Fc ϵ R1 γ) dotate di motivi **ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs)**. La loro fosforilazione attiva le

chinasi Syk e ZAP-70, scatenando la cascata del calcio che porta alla degranolazione litica.

Se una cellula tumorale down-regola l'MHC-I per sfuggire ai linfociti T CD8+, viene a mancare il segnale inibitorio mediato dagli ITIM (Missing Self). Se contemporaneamente esprime ligandi di stress come MICA/B che attivano gli ITAM tramite NKG2D, il bilancio biochimico pende decisamente verso l'attivazione cellulare.

Meccanismi di Citotossicità Effettrice delle NK

Una volta attivata, la cellula NK induce la morte programmata della cellula target attraverso due vie d'azione distinte:

1. Via Perforina/Granzima (Degranolazione Litica):

- La NK polarizza il proprio citoscheletro microtubulare verso la sinapsi stabilita con la cellula target.
- Rilascia per esocitosi il contenuto dei suoi granuli preformati. La **perforina**, in presenza di calcio extracellulare, polimerizza nella membrana plasmatica della cellula bersaglio, creando canali transmembrana aspecifici.
- I **granzimi** (in particolare il Granzima B, una serina proteasi) penetrano attraverso questi pori (o via endocitosi mediata da recettore). Una volta nel citosol della cellula target, il Granzima B taglia e attiva direttamente la **Caspasi-3** (via effettrice della morte cellulare) e la proteina pro-apoptotica **Bid**. Il taglio di Bid in tBid induce la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna, il rilascio di citocromo -c- e l'attivazione della via apoptotica intrinseca.

2. Via dei Recettori di Morte (Via Estrinseca):

- Le cellule NK attivate esprimono sulla loro superficie alti livelli di **FasL** (Fas Ligand) e **TRAIL**.
- L'interazione fisica di FasL con il recettore **Fas (CD95)** espresso sulla cellula bersaglio induce la trimerizzazione di Fas, il reclutamento della proteina adattatrice FADD e l'attivazione della **Caspasi-8**, portando all'apoptosi estrinseca indipendentemente dalla perforina.

Candidato, affrontiamo queste tematiche con il rigore analitico richiesto in sede di esame magistrale. Si tratta di argomenti cardine che esplorano le frontiere tra l'immunità innata e quella adattativa, svelando la straordinaria plasticità del nostro sistema difensivo.

1. Funzioni e Meccanismi di Citotossicità dei Linfociti T CD8+

I linfociti T CD8+ (Linfociti T Citotossici o CTL) rappresentano il braccio armato e terminale dell'immunità adattativa cellulo-mediata. La loro funzione assoluta è il riconoscimento e l'eradicazione fisica di cellule che presentano antigeni endogeni/intracellulari patologici (es. cellule infettate da virus, batteri intracellulari o cellule neoplastiche trasformate). Affinché un linfocita CD8+ naïve diventi un killer effettivo, necessita di una fine autorizzazione biochimica ("*licence to kill*"). Questa è garantita dall'incontro con l'antigene su MHC-I e dal fondamentale "help" dei linfociti CD4+ Th1, i quali producono Interleuchina-2 (IL-2, il mitogeno vitale per l'espansione del CD8) e iper-attivano le cellule dendritiche tramite l'asse CD40-CD40L.

Una volta attivato e giunto sul bersaglio, il linfocita CD8+ forma una stretta sinapsi immunologica ed esplica la sua citotossicità attraverso molteplici vie letali:

● Degranolazione Vescicolare (Via Secretoria):

- **Perforina:** Polimerizza istantaneamente nella membrana plasmatica della

- cellula bersaglio, creando macropori osmotici che destrutturano la membrana.
- **Granzimi:** Sono serin-proteasi che penetrano nel citoplasma bersaglio attraverso i pori di perforina o via endocitosi. Il Granzima B, in particolare, cliva e attiva direttamente la Caspasi-3 e la proteina pro-apoptotica Bid (troncandola in tBid), innescando la distruzione mitocondriale e l'apoptosi della cellula.
- **Granulisina (e Gransina):** Molecola che intacca direttamente i meccanismi intra-batterici e l'integrità cellulare.
- **Via dei Recettori di Morte (Apoptosi Estrinseca):** Il linfocita CD8+ up-regola sulla propria membrana il ligando pro-apoptotico Fas-L (CD95-L). Il legame violento di Fas-L con il recettore Fas (CD95) espresso dalla cellula malata clusterizza i domini di morte intracellulari, attivando la Caspasi-8 e portando celermente all'apoptosi.
- **Secrezione di Citochine Letali:** Rilasciano enormi quote di TNF- α e IFN- γ che inducono danni metabolici, arresto proliferativo e potenziamento dell'apoptosi intrinseca nella cellula bersaglio.

2. Confronto: CD8+ vs NK vs ADCC

Sebbene il fine biologico (la morte del bersaglio) sia condiviso, i meccanismi di innesco sono profondamente divergenti:

- **Linfociti T CD8+ (Restrizione MHC):** La citotossicità è altamente clonale e *adattativa*. L'uccisione avviene solo ed esclusivamente se il TCR specifico riconosce l'esatto peptide antigenico alloggiato all'interno della tasca di una molecola MHC di classe I self. È un processo che richiede giorni per l'innesco primario (espansione clonale).
- **Cellule Natural Killer (Ipotesi del Missing Self):** Le NK agiscono in modo *innato* e MHC-indipendente. Esse integrano costantemente un bilancio di segnali. Non usano un TCR clonale, bensì recettori germinali inibitori (es. KIR, NKG2A dotati di ITIM) che "tastano" la presenza dell'MHC-I sano. Se una cellula tumorale o virale down-regola l'MHC-I per sfuggire ai CD8+, perde il freno inibitorio sulle NK ("missing self"). Contestualmente, i recettori attivatori delle NK (es. NKG2D dotati di ITAM) percepiscono i ligandi da stress (MICA/MICB) esibiti dalla cellula malata, sbloccando istantaneamente il rilascio di perforine e granzimi.
- **ADCC (Citotossicità Cellulare Anticorpo-Dipendente):** È un meccanismo *ibrido*. In questo caso, le cellule innate (soprattutto le NK citotossiche CD56dim, ma anche macrofagi) sfruttano un potentissimo recettore transmembrana, il CD16 (Fc γ RIII). Il CD16 non riconosce antigeni o MHC, ma si lega saldamente al frammento cristallizzabile (Fc) delle immunoglobuline (IgG1, IgG3) che hanno preventivamente opsonizzato (rivestito) un patogeno o una cellula tumorale. Il *cross-linking* del CD16 forza spazialmente la degranolazione mirata contro il bersaglio, fungendo da letale ponte tra immunità umorale e citotossicità innata.

3. I Linfociti T $\gamma\delta$: Ibridi di Sorveglianza

I linfociti T $\gamma\delta$ sono sentinelle elitarie e non convenzionali. Rari nel sangue (1-10%), dominano l'immunità tissutale di frontiera (mucose e cute).

- **Origini e TCR:** Originano nel timo e sviluppano un TCR formato dalle catene γ e δ . Sebbene il loro TCR sia prodotto per riarrangiamento somatico, la loro variabilità recettoriale è limitata (semi-invarianti).
- **Riconoscimento dei Fosfoantigeni:** La loro caratteristica più formidabile (specie per il clone umano dominante V γ 9-V δ 2) è di essere totalmente slegati dal complesso

MHC. Essi non riconoscono peptidi, bensì *fosfoantigeni*, come l'isopentenil pirofosfato (IPP). L'IPP viene iperprodotto sia dai patogeni, sia dalle nostre cellule in condizioni di stress neoplastico o ipermetabolico (via del mevalonato).

- **Meccanismo di interazione (BTN3A1):** Il riconoscimento non è classico. L'accumulo di IPP intracellulare lega lo scudo citosolico (B30.2) della molecola di membrana Butirrofillina (BTN3A1). Questo legame induce uno "shift conformazionale" della butirrofillina che, esponendo domini modificati all'esterno, allaccia violentemente e selettivamente le regioni CDR3 del TCR V γ 9, innescando l'attivazione.
- **Meccanismi TCR-indipendenti:** Parallelamente, le cellule T $\gamma\delta$ esibiscono un comportamento innato: possiedono i recettori delle NK come NKG2D (per intercettare le molecole da stress MICA/MICB, HLA-E) e il recettore CD16 per orchestrare l'ADCC indipendentemente dal fosfoantigene.
- **Confronto con le NK:** Condividono con le NK la profonda capacità di agire in modo innato ed indipendente dall'MHC, l'espressione di NKG2D, l'uso di citotossicità mediata da perforine/granzimi e la secrezione di IFN- γ senza necessità di un'estenuante espansione clonale di giorni. La vera differenza risiede nella natura molecolare del loro sensore primario: le NK usano recettori inibitori/attivatori germinali, i T $\gamma\delta$ impiegano un recettore somatico (TCR) per leggere il metabolismo fosfolipidico alterato.

4. Cellule MAIT e Cellule iNKT (Linfociti Invarianti)

Entrambe le popolazioni rappresentano cloni linfocitari T non convenzionali, adattati evolutivamente per riconoscere rapidissimamente molecole non proteiche, collocandosi all'interfaccia tra immunità innata e adattativa.

- **Cellule iNKT (Natural Killer T Invarianti):** Sono ibridi molecolari. Esprimono sia marcatori tipici dei linfociti T (un TCR semi-invariante, tipicamente V α 24-J α 18) sia marcatori delle NK (KIR e KAR). La loro specialità è riconoscere *glicolipidi* patogeni (es. acidi micolici del micobatterio) o molecole come l' α -galattosilceramide. Questi lipidi non vengono presentati da MHC, bensì dalla molecola **CD1d**, una glicoproteina specializzata dotata di una profonda tasca idrofobica per accogliere le catene lipidiche. Le NKT agiscono come formidabili amplificatori: appena attivate degranulano citotossicamente e secernono torrenti di citochine per attivare macrofagi, dendritiche e cellule B.
- **Cellule MAIT (Mucosal-Associated Invariant T):** Residenti primariamente nell'intestino e nel tratto respiratorio, la loro proliferazione e sopravvivenza dipendono fisicamente dalla presenza del nostro microbiota commensale. Esprimono un TCR altamente restrittivo (V α 7.2-J α 33). Non leggono né peptidi né lipidi, bensì *metaboliti intermedi della vitamina B2* (riboflavina) sintetizzati esclusivamente dai batteri e presentati dalla complessa molecola non classica **MR1** (MHC-Related 1). Uscite dal timo possiedono già un fenotipo memory-like, il che le rende pronte a esplodere in frazioni di secondo a scopi antimicrobici, sia in modo MR1-dipendente che in modo citochino-dipendente (via IL-12/IL-18).

5. Cellule Linfoidi Innate (ILC) e ruolo delle ILC2

Le Cellule Linfoidi Innate (ILC) originano dal Common Lymphoid Progenitor (CLP) ma mancano totalmente dei recettori clonali per l'antigene (non presentano né TCR né BCR) e non attuano riarrangiamento somatico RAG-dipendente. Per il loro differenziamento e la loro

sopravvivenza periferica, dipendono biochimicamente da due cardini: il repressore trascrizionale ID2 e la segnalazione mandatoria dell'**IL-7** tramite l'espressione del recettore IL-7R α e della catena γ -comune (unica eccezione le NK, che usano IL-15).

Si classificano in base al fenotipo citochinico secreto, operando come l'esatto *specchio innato* dei subset linfocitari Th adattativi:

1. **ILC1 (che includono le NK)**: Speculari ai Th1. Guidano l'attacco contro virus e batteri intracellulari producendo IFN- γ .
2. **ILC2**: Speculari ai Th2.
3. **ILC3 (che includono le LTI)**: Speculari ai Th17/Th22. Gestiscono l'omeostasi delle mucose secernendo IL-17 e IL-22.

Il Ruolo Specifico delle ILC2: Le ILC2 risiedono nei tessuti connettivi sottomucosi e negli epitelii. La loro attivazione non dipende dal patogeno in sé, ma dal "pianto tissutale". Quando allergeni, elminti o tossine ledono le gap junction epiteliali, le cellule danneggiate liberano prepotenti allarmine molecolari endogene: **IL-25**, **IL-33** e **TSLP** (Linfopoiatina stromale timica). Queste allarmine attivano selettivamente le ILC2, le quali rispondono inondando l'ambiente di citochine di tipo 2, come l'**IL-5** (che recluta e fa degranulare catastroficamente gli eosinofili) e l'**IL-13** (che induce ipersecrezione di muco caliciforme e broncocostrizione). Le ILC2 fungono quindi da primissimi accenditori innati e da innesco fisiopatologico devastante nel contesto delle crisi asmatiche e delle ipersensibilità allergiche.

6. Le Cellule LTI (Lymphoid Tissue Inducer cells)

Classificate nel macro-gruppo delle ILC3, le cellule LTI possiedono un ruolo biologico sbalorditivo che trascende la mera difesa microbiologica: esse sono vere e proprie "*induttrici d'architettura*" durante l'embriogenesi.

- **Organogenesi Linfoidale**: Secernendo linfo-tossine e chemochine stromali, le LTI reclutano fibroblasti e guidano istologicamente lo sviluppo, la stesura e l'architettura tridimensionale degli organi linfoidi primari e secondari (es. linfonodi, milza e GALT enterico).
- **Ruolo Vitale nella Tolleranza Centrale**: A livello del timo, i precursori maturanti intrattengono contatti essenziali con lo stroma. Le cellule LTI sono le cellule chiave che espongono il ligando **RANKL**. Legandosi al recettore **RANK** espresso dalle cellule epiteliali midollari del timo (mTEC), le LTI innescano l'indispensabile trasduzione biochimica che forza le mTEC ad accendere il promotore pleiotropico del gene **AIRE**. Senza l'intervento morfogenetico e recettoriale delle cellule LTI, il gene **AIRE** non verrebbe trascritto, la tolleranza centrale fallirebbe per assenza di presentazione ectopica periferica, e l'individuo andrebbe incontro ad un'apocalittica autoimmunità poliendocrina fatale.

5. Immunità Adattativa Umorale (B e Anticorpi)

Candidato, l'attivazione dei linfociti B e la complessa coreografia molecolare che porta alla reazione del centro germinativo rappresentano uno dei capitoli più affascinanti e rigorosi dell'immunologia adattativa. Risponderò ai suoi quesiti analizzando nel dettaglio i meccanismi biochimici, cellulari e le relative implicazioni cliniche.

1. Attivazione dei Linfociti B e Risposta Timo-Dipendente (TD)

L'attivazione dei linfociti B può avvenire secondo due modalità principali: Timo-indipendente (TI), mediata da antigeni multivalenti non proteici che cross-linkano massicciamente il BCR, e **Timo-dipendente (TD)**, che richiede l'assistenza cooperativa dei linfociti T helper e riguarda gli antigeni di natura proteica.

Il Segnale 1: Cross-linking del BCR e Corecettore B

La cascata ha inizio nei follicoli linfoidi degli organi linfatici secondari. Quando un linfocita B naïve incontra il suo antigene proteico specifico in forma nativa solubile (o adeso alla membrana di macrofagi della fessura subcapsulare), si verifica il **cross-linking (legame multivalente)** dei recettori di membrana IgM o IgD.

- I domini citoplasmatici delle catene accessorie **Ig α (CD79a)** e **Ig β (CD79b)** possiedono motivi **ITAM** (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*), che vengono fosforilati dalle tirosina-chinasi della famiglia Src (Blk, Fyn, Lyn).
- Questo evento crea un sito d'attracco per la chinasi **Syk**, la quale attiva la fosfolipasi C- γ 2 (PLC γ 2), innescando le tre vie trasduzionali canoniche: la via del calcio/NFAT, la via della PKC/NF- κ B e la via delle MAP-chinasi/AP-1.
- *Amplificazione del segnale*: Il segnale primario viene enormemente potenziato (fino a 10.000 volte) dall'attivazione del **complesso corecettoriale del linfocita B**, costituito da **CR2 (CD21)**, **CD19** e **CD81**. Se l'antigene è opsonizzato dal frammento del complemento **C3d**, CD21 lega C3d mentre il BCR lega l'antigene. Ciò induce la fosforilazione della coda citoplasmatica di CD19 da parte di Lyn, reclutando la PI3-chinasi (PI3K) e amplificando drammaticamente i segnali di sopravvivenza.

La Migrazione e il Dialogo sulla Giunzione B-T

Una volta captato l'antigene, il linfocita B lo internalizza per endocitosi mediata da recettore, lo processa all'interno del compartimento endosomiale e ne espone i peptidi immunogenici sulle molecole **MHC di classe II**. Per ricevere l'aiuto dei linfociti T, il linfocita B deve migrare verso la zona paracorticale (area T).

Questo spostamento spaziale è orchestrato da un finissimo bilancio recettoriale chemochinico:

- Il linfocita B attivato down-regola parzialmente il recettore **CXCR5** (il cui ligando è CXCL13, espresso nelle aree B) e up-regola drasticamente il recettore **CCR7** (i cui ligandi sono CCL19 e CCL21, secreti nelle aree T).
- Specularmente, i linfociti T helper naïve, che sono stati attivati dalle cellule dendritiche interdigitate nell'area T, iniziano a differenziarsi in **Linfociti T helper follicolari (Tfh)**: essi up-regolano **CXCR5** e down-regolano **CCR7**.

Questo gradiente incrociato spinge entrambe le popolazioni cellulari a incontrarsi esattamente alla **giunzione cortico-midollare o bordo del follicolo**. In questa sede avviene il fitto contatto fisico: il TCR del linfocita Tfh riconosce il complesso peptide-MHC-II esibito dal linfocita B, stabilendo la sinapsi immunologica T-B.

Da questo primo incontro originano due destini biologici:

1. **Focolaio Primario (Extra-follicolare)**: Alcune coppie T-B migrate nella zona midollare danno vita a una progenie di *plasmablasti a breve vita*, deputati alla secrezione precoce e massiva di IgM a bassa affinità per un primo sbarramento difensivo.
2. **Generazione del Centro Germinativo**: Altre coppie T-B attivate invertono nuovamente il gradiente chemochinico e rientrano nel cuore del follicolo linfoide, colonizzandolo per dare inizio alla spettacolare reazione del centro germinativo.

2. L'Interazione CD40-CD40L e la Sindrome da Iper-IgM

Il legame antigenico MHC-II/TCR (Segnale 1 per il linfocita T) non è sufficiente a indurre la maturazione immunologica del linfocita B. Il processo richiede imperativamente il secondo segnale costimolatorio fornito dall'interazione tra la molecola **CD40** (espressa costitutivamente sulla membrana del linfocita B) e il suo ligando **CD40L (CD154)**, una

proteina trimerica transmembrana che viene espressa sulla superficie del linfocita Tfh solo in seguito alla sua corretta attivazione.

Effetti Molecolari del Segnale CD40-CD40L

L'ingaggio di CD40 sul linfocita B recluta nel versante citoplasmatico le proteine adattatrici **TRAF** (*TNF Receptor-Associated Factors*), attivando con violenza la via canonica e non canonica del fattore di trascrizione **NF- κ B** e la via di Akt. Questo segnale biochimico determina:

1. L'induzione di proteine anti-apoptotiche (come Bcl-xL), garantendo la sopravvivenza clonale.
2. La spinta verso una proliferazione cellulare tumultuosa.
3. L'attivazione trascrizionale dell'enzima chiave **AID** (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*), il motore molecolare responsabile sia dell'Ipermutazione Somatica (SHM) sia della Ricombinazione per lo Switch Isotipico (CSR).

Correlazione Clinica: La Sindrome da Iper-IgM di Tipo 1 (HIGM1)

Qualora si verifichi una mutazione genetica a carico del gene che codifica per il CD40L (localizzato sul cromosoma X, determinando una trasmissione ereditaria *X-linked recessiva*), il linfocita Tfh è strutturalmente incapace di costimolare il linfocita B.

Quadro Immunologico e Clinico:

- **Assenza di Switch Isotipico:** Il linfocita B, pur captando gli antigeni, è confinato a una risposta puramente primaria extra-follicolare. Può produrre unicamente **IgM**, che fluttuano a livelli sierici normali o marcatamente elevati (da cui il nome della sindrome). Vi è invece il totale azzeramento dei livelli di **IgG, IgA ed IgE**.
- **Mancata Formazione dei Centri Germinativi:** All'esame istologico dei linfonodi di questi pazienti si nota la completa assenza di centri germinativi e di linfociti B della memoria.
- **Suscettibilità Infettiva Catastrofica:** I pazienti manifestano fin dall'infanzia gravi infezioni piogeniche ricorrenti a carico dell'apparato respiratorio e gastroenterico, sostenute da batteri capsulati (es. *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae*), data l'assenza di IgG opsonizzanti.
- **Infezioni Opportunistiche e Deficit Macrofagico:** Sorprendentemente, questi pazienti sono anche gravemente suscettibili a patogeni opportunistici intracellulari, in particolare alle polmoniti da *Pneumocystis jirovecii*. Questo avviene perché l'asse CD40-CD40L non è esclusivo dei linfociti B: i linfociti T helper usano il medesimo CD40L per legarsi al CD40 espresso sulla membrana dei **macrofagi**, segnale che, in sinergia con l'IFN- γ , è indispensabile per l'attivazione classica (M1) e l'eradicazione dei microbi endocellulari. La sua assenza paralizza la cooperazione immunitaria cellulare a tutto tondo.

3. Dinamiche del Centro Germinativo e Crosstalk con le FDC

Il centro germinativo (CG) è una struttura istologica transitoria e altamente polarizzata che si sviluppa all'interno del follicolo linfoide primario (trasformandolo in follicolo secondario) circa 4-7 giorni dopo l'esposizione all'antigene TD. Sotto il profilo anatomico e funzionale, il CG si divide nettamente in due compartimenti: la **Zona Scura** e la **Zona Chiara**.

La Zona Scura: Proliferazione e Ipermutazione Somatica (SHM)

Nel compartimento della zona scura, i linfociti B mutano il proprio fenotipo in **centroblasti**. I centroblasti sono cellule voluminose, intensamente basofile, caratterizzate da un ciclo cellulare rapidissimo (uno dei più veloci nel regno animale, con divisioni ogni 6-8 ore) e dalla transitoria down-regulation dell'espressione superficiale del BCR.

In questa fase si attiva massicciamente l'enzima **AID**. AID deamina chimicamente i residui di

citidina in uridina all'interno dei loci genici riarrangiati -V(D)J- delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline. I successivi meccanismi di riparazione del DNA (sub-ottimali per scelta evolutiva) introducono mutazioni puntiformi casuali con una frequenza sproporzionata (-10^{-3} - paia di basi per generazione cellulare, nota come **Ipermutazione Somatica**). Questo processo modifica in modo stocastico la sequenza aminoacidica delle regioni ipervariabili (CDR) deputate al legame con l'antigene.

La Zona Chiara: Il Crosstalk con le FDC e la Selezione Affinità-Dipendente

Esaurita la fase replicativa, i centroblasti cessano di dividersi, riducono le proprie dimensioni, ri-esprimono sulla membrana il BCR (ora modificato dalle mutazioni) e migrano nella **Zona Chiara**, assumendo il nome di **centrociti**.

Nella zona chiara si decide il destino biologico del clone. Poiché le mutazioni introdotte dall'AID sono casuali, la maggior parte dei centrociti esprimerà un BCR con affinità immutata, ridotta o addirittura nulla verso l'antigene originale; solo una minoranza protetta esprimerà un BCR ad altissima affinità. La selezione clonale salvifica avviene grazie a un raffinato crosstalk biologico bidirezionale tra i centrociti, le **Cellule Dendritiche i (FDC)** e i linfociti Tfh residenti nella zona chiara.

1. **Il Ruolo delle FDC come Serbatoi d'Antigene:** Le FDC non sono cellule di origine emopoietica (differiscono totalmente dalle cellule dendritiche classiche), ma sono cellule stromali di origine mesenchimale dotate di lunghi prolungamenti citoplasmatici dendritici che formano un reticolo statico nel follicolo. Esse non processano l'antigene e non esprimono MHC-II. Al contrario, trattengono sulla loro membrana l'antigene nativo intatto per mesi o anni sotto forma di complessi immuni stabili, ancorati tramite i recettori per il complemento **CR1/CR2** e i recettori per il frammento Fc delle IgG (**FcγR**). Queste strutture vescicolari adese ai loro dendriti prendono il nome di **iccosomi**.
2. **La Competizione per l'Antigene:** I centrociti ingaggiano una spietata competizione spaziale per legare gli antigeni esposti sulle FDC.
 - **Se il BCR del centrocita ha bassa affinità:** Non riesce a scalzare gli altri cloni, non riceve segnali di sopravvivenza dalle FDC e non riesce a internalizzare l'antigene. Destinato all'anergia, va incontro a una rapidissima morte per apoptosi (*death by neglect*) e viene fagocitato dai macrofagi a corpi tingibili.
 - **Se il BCR del centrocita ha alta affinità:** Si ancora saldamente all'antigene dell'iccosoma, generando un segnale tonico di sopravvivenza. Il centrocita internalizza il complesso per endocitosi, processa la proteina e ne espone i peptidi su MHC-II.
3. **La Presentazione Finale ai Linfociti Tfh:** Il centrocita ad alta affinità migra verso i linfociti Tfh della zona chiara per presentare loro l'antigene su MHC-II. Il linfocita Tfh, riconosciuto il complesso, ricompensa il centrocita fornendogli segnali di sopravvivenza terminali tramite l'asse **CD40-CD40L** e secernendo citochine cruciali come l'**IL-21** e l'**IL-4**. Questo processo ciclico prende il nome di **Maturazione dell'Affinità** della risposta anticorpale.

L'Esito del Centro Germinativo:

I centrociti che superano indenni questa rigorosa selezione affrontano il loro differenziamento terminale, guidato dalle citochine del Tfh (che mediano anche lo *Switch Isotipico* o *CSR*, modificando la regione costante della catena pesante da IgM a IgG, IgA o IgE mantenendo inalterata la specificità della tasca):

- Si convertono in **Plasmacellule a lunga vita:** grandi fabbriche proteiche che

down-regolano CXCR5, up-regolano **CXCR4** e migrano stabilmente nel midollo osseo (attratte dalla chemochina midollare CXCL12) per secernere anticorpi ad altissima affinità per decenni.

- Si convertono in **Linfociti B della memoria**: cellule quiescenti a riposo che pattugliano i tessuti e la linfa, pronte a scatenare una risposta secondaria fulminea in caso di successivo reincontro con lo stesso patogeno.

Benvenuto a questa sessione avanzata di immunologia molecolare e immunopatologia. Affronteremo ora in modo analitico la biologia delle risposte umorali, analizzando i meccanismi genetici e recettoriali che governano l'efficacia delle immunoglobuline.

1. Confronto tra Risposta Anticorpale Primaria e Secondaria

La risposta umorale adattativa si articola in due fasi distinte a seconda che il sistema immunitario incontra l'antigene per la prima volta (primaria) o in occasioni successive (secondaria).

- **Fase di Latenza (Lag Phase):** * *Risposta Primaria:* È prolungata, oscillando tipicamente tra i 5 e i 10 giorni. Questo tempo è biologicamente necessario affinché i rari linfociti B naïve specifici per quell'epitopo incontrino l'antigene nei linfonodi, lo processino, ricevano la costimolazione dai T helper (se l'antigene è Timo-dipendente) e vadano incontro all'espansione clonale extrafollicolare.
 - *Risposta Secondaria:* È estremamente ridotta (1-3 giorni). I linfociti B della memoria, generati durante la prima risposta, sono numericamente superiori, posseggono già recettori ad alta affinità e rispondono a soglie di attivazione molto più basse, differenziandosi quasi istantaneamente in plasmablasti.
- **Picco ed Entità della Risposta:**
 - *Risposta Primaria:* Raggiunge un picco anticorpale modesto.
 - *Risposta Secondaria:* Il titolo anticorpale è esponenzialmente più elevato (da 100 a 1000 volte superiore rispetto alla primaria) e persiste a livelli protettivi per tempi notevolmente più lunghi.
- **Isotipo Prevalente:**
 - *Risposta Primaria:* È dominata dalle **IgM**, secrete precocemente sotto forma di pentameri dai plasmablasti extrafollicolari a breve vita. Le IgG compaiono solo tardivamente.
 - *Risposta Secondaria:* Vi è una netta e immediata prevalenza di **IgG** (o **IgA** nelle mucose, **IgE** nelle risposte parassitarie/allergiche), grazie al fatto che le cellule della memoria hanno già effettuato la ricombinazione per lo switch di classe.
- **Affinità Anticorpale:**
 - *Risposta Primaria:* L'affinità iniziale è bassa o moderata, riflettendo la sequenza germinale del BCR originale.
 - *Risposta Secondaria:* L'affinità è altissima ed evolve progressivamente verso un legame sempre più serrato (maturazione dell'affinità), poiché deriva da cloni già selezionati nei centri germinativi.
- **Natura dell'Antigene:**
 - *Risposta Primaria:* Può essere evocata sia da antigeni Timo-dipendenti (TD, proteici) sia da antigeni Timo-indipendenti (TI, polisaccaridici o lipidici multivalenti).
 - *Risposta Secondaria:* È scatenata quasi esclusivamente da antigeni **Timo-dipendenti**, gli unici capaci di indurre la formazione dei centri

germinativi e la conseguente generazione di memoria immunologica immunonutrita.

2. Maturazione dell'Affinità (Regioni CDR) e Switch Isotipico (CSR)

Entrambi questi processi avvengono nel centro germinativo e sono orchestrati dall'enzima **AID** (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*), la cui espressione è attivata dal segnale costimolatorio CD40-CD40L.

Maturazione dell'Affinità e le Regioni CDR

La maturazione dell'affinità è il processo mediante il quale la risposta umorale produce anticorpi con una capacità di legame progressivamente maggiore verso l'antigene. Avviene attraverso due tappe fondamentali:

1. **Ipermutazione Somatica (SHM):** Nella zona scura del centro germinativo, i centroblasti in rapida mitosi attivano l'enzima AID. AID deamina chimicamente le citidine in uridine negli esoni che codificano per le regioni variabili (-V_H- e -V_L-) delle catene pesanti e leggere. I successivi meccanismi di riparazione del DNA introducono mutazioni puntiformi casuali con una frequenza straordinariamente elevata.
2. **Focalizzazione sulle regioni CDR:** Le mutazioni si concentrano selettivamente all'interno delle **regioni determinanti la complementarità (CDR1, CDR2, CDR3)**, note come regioni ipervariabili. Le CDR sono tre loop aminoacidici flessibili che, ripiegandosi nello spazio, formano fisicamente la tasca di legame (il *paratope*) per l'epitopo dell'antigene.
3. **Selezione nella Zona Chiara:** I centrociti mutati migrano nella zona chiara dove competono per legare gli antigeni nativi esposti sulle cellule dendritiche follicolari (FDC). Solo i centrociti le cui mutazioni casuali nelle regioni CDR hanno **aumentato l'affinità** del BCR riescono a catturare l'antigene, a internalizzarlo, a presentarlo sui complessi MHC-II ai linfociti Tfh e a ricevere da questi ultimi i segnali di sopravvivenza (IL-21, CD40L). I cloni con mutazioni svantaggiose nelle CDR vanno incontro ad apoptosi.

Lo Switch Isotipico (Ricombinazione per lo Switch di Classe - CSR)

La CSR consente a un linfocita B di cambiare la regione costante della catena pesante (-C_H-), modificando la funzione effettrice dell'anticorpo (da IgM a IgG, IgA o IgE) senza alterare la specificità antigenica, che rimane legata ai domini variabili riarrangiati.

- **Meccanismo Genetico:** A monte di ogni gene che codifica per una regione costante (ad eccezione del gene -C_{delta}-), si trovano lunghe sequenze introniche ripetitive ricche di GC chiamate **regioni o regioni di Switch (S)** (es. -S_{mu}-, -S_{gamma}-, -S_{alpha}-, -S_e-).
- L'enzima AID deamina le citidine nelle regioni S bersaglio. L'azione coordinata dell'enzima UNG (Uracil-DNA glicosilasi) e delle endonucleasi trasforma questi siti in rotture della doppia elica del DNA (DSBs).
- Se il linfocita Tfh ordina uno switch verso le IgE, ad esempio tramite la secrezione di **IL-4**, il DNA si ripiega spazialmente facendo combaciare la regione -S_{mu}- (posta a monte di -C_{mu}-) con la regione -S_e- (posta a monte di -C_e-).
- Il segmento di DNA intermedio, contenente i geni per le catene costanti intermedie (-C_{mu}, C_{delta}, C_{gamma}-), viene fisicamente escisso sotto forma di un anello di delezione. Le due estremità distanti del DNA vengono saldate mediante il meccanismo di riparazione non omologa delle estremità (**NHEJ**). Da quel momento, il trascritto primario salderà l'esone variabile -V(D)J- originale direttamente al nuovo

locus -C\le-.

3. Struttura Base delle Immunoglobuline e Recettori Fc (FcR)

Struttura Base delle Immunoglobuline

Un'immunoglobulina monomerica è un eterotetramero a forma di "Y" composto da quattro catene polipeptidiche speculari, unite stabilmente da ponti disolfuro intercatena:

- **Due Catene Leggere (L) identiche:** Costituite da un dominio variabile (-V_L-) e un dominio costante (-C_L-). Possono essere di tipo Kappa (-\kappa-) o Lambda (-\lambda-).
- **Due Catene Pesanti (H) identiche:** Costituite da un dominio variabile (-V_H-) e tre o quattro domini costanti (-C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, [C_{H4}]-). La natura della catena pesante definisce la classe (o isotipo) dell'anticorpo: -\mu- (IgM), -\delta- (IgD), -\gamma- (IgG), -\alpha- (IgA), -\epsilon- (IgE).

Dal punto di vista funzionale e proteolitico, la molecola si divide in:

- **Regione Fab (Fragment Antigen-Binding):** Corrisponde alle due braccia superiori della Y. Comprende i domini variabili (-V_H, V_L-) e i primi domini costanti (-C_{H1}, C_L-). Contiene le regioni CDR ed è responsabile del legame sterico con l'antigene.
- **Regione Cerniera (Hinge Region):** Segmento aminoacidico flessibile ricco di proline e cysteine situato tra il -C_{H1}- e il -C_{H2}-. Permette alle braccia Fab di muoversi nello spazio per intercettare epitopi a distanze variabili. (Manca in IgM ed IgE, che presentano un dominio -C_{H4}- aggiuntivo).
- **Regione Fc (Fragment Crystallizable):** Corrisponde allo stelo inferiore della Y ed è composta esclusivamente dai domini costanti terminali delle catene pesanti (-C_{H2}, C_{H3}-). Questa regione non lega l'antigene, ma definisce l'attività biologica dell'anticorpo interagendo con le proteine del complemento e con i recettori cellulari FcR.

Principali Recettori per le Immunoglobuline (FcR)

I recettori Fc riconoscono la regione Fc degli anticorpi solo quando questi sono legati all'antigene (complessi immuni), garantendo che l'attivazione cellulare avvenga esclusivamente in risposta a una minaccia reale.

1. **FcγRI (CD64):** Recettore ad **alta affinità** per le catene pesanti -\gamma- di IgG1 e IgG3. È l'unico capace di legare anche l'IgG monomerica libera in circolo. Espresso costitutivamente su macrofagi e neutrofilii; possiede un dominio citoplasmatico associato a catene -\gamma- dotate di motivi **ITAM** (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Promuove con forza la fagocitosi e il burst respiratorio.
2. **FcγRII (CD32):** Diviso in due isoforme funzionalmente opposte:
 - *FcγRIIA*: Recettore attivatorio a bassa affinità espresso su fagociti e piastrine per la cattura di complessi immuni.
 - *FcγRIIB (CD32b)*: L'unico **recettore Fc inibitorio**. Contiene nella sua coda citoplasmatica un motivo **ITIM** (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*). Espresso sui linfociti B e sui mastociti, recluta la fosfatasi SHIP-1 e agisce da freno biochimico omeostatico (feedback negativo): quando le IgG secrete sono in eccesso, cross-linkano il BCR con FcγRIIB, spegnendo l'attivazione della cellula B.
3. **FcγRIII (CD16):** Recettore a **bassa affinità**. L'isoforma *FcγRIIIA* è espressa selettivamente sulla membrana delle **cellule Natural Killer (NK)**. Lega le IgG aggregate sulla superficie di una cellula bersaglio e attiva i motivi ITAM, inducendo la citotossicità cellulare antibody-dipendente (ADCC) e la degranolazione di perforine e

granzimi.

4. **FcεRI**: Recettore ad **altissima affinità** per le catene α - delle IgE. Espresso sulla membrana di mastociti, basofili ed eosinofili. Lega l'IgE libera con tale forza da saturarsi anche in condizioni di parassitosi assente. Quando l'antigene multimerico (allergene) cross-linka le IgE adese a FcεRI, scatena un massiccio afflusso di calcio che porta all'esocitosi esplosiva dei granuli preformati di istamina e leucotrieni.

4. Funzioni Effettrici delle IgG e Ruolo del Recettore Neonatale (FcRn)

Funzioni Effettrici delle IgG

L'isotipo IgG è la classe anticorpale più rappresentata nel siero (~80%) ed esplica il più vasto spettro di funzioni protettive:

1. **Oponizzazione e Fagocitosi**: Le IgG (in particolare IgG1 e IgG3) rivestono la superficie dei patogeni extracellulari. I fagociti (macrofagi e neutrofili) utilizzano i recettori FcγRI per agganciarsi saldamente alla regione Fc delle IgG opsonizzanti, estendendo gli pseudopodi ed endocitando il microorganismo nel fagosoma.
2. **Attivazione della Via Classica del Complemento**: Quando due o più molecole di IgG si legano a epitopi adiacenti sulla membrana di un microbio, le loro regioni Fc subiscono una modificazione conformazionale che espone i siti di legame per la testa globulare della proteina plasmatica **C1q**. L'ingaggio di C1q attiva la cascata proteolitica del complemento, portando alla generazione delle opsonine C3b, delle anafilossine (C3a, C5a) e alla formazione del Complesso di Attacco alla Membrana (MAC/Lisi osmotica).
3. **Citotossicità Cellulare Antibody-Dipendente (ADCC)**: Le IgG si legano ad antigeni esibiti sulla superficie di cellule infettate da virus o cellule tumorali. Le cellule NK intercettano queste IgG tramite il recettore CD16 (FcγRIII), attivando il programma di lisi secretoria cellulare.
4. **Neutralizzazione**: Le IgG bloccano stericamente i siti attivi delle tossine batteriche (es. tossina tetanica o difterica) o le proteine di membrana virali (es. la proteina Spike dei coronavirus), impedendo fisicamente il loro legame ai recettori cellulari dell'ospite e prevenendo l'infezione.

Il Ruolo del Recettore Neonatale (FcRn) e l'Immunità Materno-Fetale

Il feto possiede un sistema immunitario immaturo ed è protetto durante la gestazione esclusivamente dagli anticorpi materni. L'unica classe anticorpale in grado di attraversare la barriera placentare è rappresentata dalle IgG, un trasporto selettivo interamente mediato dal recettore **FcRn**.

- **Struttura di FcRn**: Da un punto di vista strutturale, FcRn non appartiene alla famiglia genica dei classici FcR. È un eterodimero strutturalmente omologo alle molecole **MHC di classe I**, formato da una catena pesante polimorfica associata non covalentemente alla **β_2 -microglobulin**.
- **Meccanismo di Trasferimento Placentare**:
 1. Le cellule del **sinciziotrofoblasto** placentare, che si trovano a diretto contatto con il sangue materno, internalizzano continuamente le proteine plasmatiche (inclusi gli anticorpi della madre) tramite un processo aspecifico di pinocitosi.
 2. All'interno delle vescicole endocitiche si verifica un processo di acidificazione guidato dalle pompe protoniche, che fa scendere il **pH a livelli inferiori a 6.0**.
 3. In questo ambiente acido, la regione Fc delle IgG materne subisce modificazioni protoniche che le consentono di legarsi con alta affinità ai recettori FcRn espressi sulla membrana endosomiale. Le altre proteine (es.

albumina non legata, IgM, IgA) rimangono libere nel lume.

4. L'endosoma viene smistato evitando i lisosomi (transcitosi). Le IgG legate a FcRn sono così protette dalla degradazione proteolitica.
 5. La vescicola si fonde infine con la membrana basolaterale del trofoblasto, esposta verso l'endotelio dei capillari fetali. A questo livello, l'incontro con il pH neutro del sangue fetale (-\approx 7.4-) annulla istantaneamente l'affinità di legame tra la Fc delle IgG e l'FcRn. L'anticorpo si dissocia dal recettore e viene rilasciato intatto nel circolo sanguigno del feto.
- **Omeostasi e l'Emivita delle IgG:** Questo medesimo meccanismo molecolare dipendente dal pH viene sfruttato dalle cellule endoteliali e dai podociti renali per tutta la vita adulta dell'individuo. FcRn ricicla continuamente le IgG tissutali internalizzate per pinocitosi, sottraendole alla distruzione lisosomiale e riversandole nuovamente intatte nel plasma. Questo crosstalk recettoriale conferisce alle IgG una straordinaria emivita biologica (~21 giorni), nettamente superiore a quella di qualsiasi altro isotipo anticorpale.

Candidato, affrontiamo lo studio delle due classi immunoglobuliniche polari e specializzate del nostro sistema immunitario: le **IgA** (guardiane dell'omeostasi mucosale) e le **IgE** (mediatrici della difesa antiparassitaria e della patologia allergica). Analizzeremo nel dettaglio la loro biologia molecolare, i meccanismi recettoriali e la rilevanza clinica.

1. Immunoglobuline A (IgA): Produzione, Localizzazione e Funzioni

Le IgA rappresentano l'isotipo quantitativamente più sintetizzato dall'organismo umano su scala giornaliera (circa 66 mg/kg/die), superando la produzione di tutte le altre classi anticorpali messe insieme, a testimonianza dell'immensa estensione superficiale delle nostre barriere mucosali.

Produzione e Switch Isotipico

La sintesi delle IgA avviene prevalentemente a livello dei tessuti linfoide associati alle mucose (**MALT**, come il GALT intestinale e il BALT respiratorio) ad opera di plasmacellule specializzate.

- **I Segnali di Polarizzazione:** Il differenziamento e lo switch di classe (CSR) da IgM a IgA è finemente orchestrato dal **TGF- β** (*Transforming Growth Factor-beta*), secreta in modo predominante dalle cellule dendritiche tollerogene mucosali e dalle cellule T regolatrici.
- Il TGF- β agisce in sinergia con l'**acido retinoico** (derivato dal metabolismo della vitamina A) e con fattori di sopravvivenza locali quali **BAFF** (*B-cell activating factor*) e **APRIL** (*a proliferation-inducing ligand*), inducendo l'apertura del locus genico -C\alpha- e attivando l'enzima **AID** per la ricombinazione genetica.
- **Forma Molecolare:** A livello sistemico (nel siero), le IgA si trovano principalmente sotto forma di **monomeri** (prevalentemente la sottoclasse IgA1). Nelle secrezioni mucosali, invece, le plasmacellule secernono le IgA sotto forma di **dimeri** (prevalentemente IgA2). La dimerizzazione è resa possibile dalla **catena J (Joining chain)**, un polipeptide di 15 kDa sintetizzato dalla plasmacellula stessa che unisce covalentemente tramite ponti disolfuro i domini costanti terminali (-C\alpha3-) di due monomeri di IgA.

Localizzazione e Meccanismo di Secrezione (Transcitosi)

Le IgA dimeriche prodotte nella lamina propria delle mucose devono attraversare la barriera epiteliale per raggiungere il lume esocrino. Questo processo dinamico è noto come **transcitosi** ed è interamente mediato dal **pIgR** (*polymeric Immunoglobulin Receptor*):

1. **Legame Basolaterale:** Il dimero di IgA provvisto di catena J si lega selettivamente al pIgR, espresso sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali.
2. **Endocitosi e Trasporto:** Il complesso IgA-pIgR viene internalizzato all'interno di vescicole endocitiche e trasportato attivamente attraverso il citoplasma verso il versante apicale della cellula (senza subire degradazione lisosomiale).
3. **Clivaggio Proteolitico:** Raggiunta la membrana apicale (luminale), un'endopeptidasi specifica cliva la porzione extracellulare del pIgR.
4. **Rilascio della IgA Secretoria (sIgA):** Il frammento recettoriale clivato rimane ancorato al dimero anticorpale e assume il nome di **Componente Secretorio (SC)**. Il componente secretorio è di vitale importanza: avvolgendo i domini Fc dell'anticorpo, maschera i siti di taglio delle idrolasi batteriche e degli enzimi proteolitici gastrici e pancreatici, conferendo alla sIgA una straordinaria stabilità strutturale nel microambiente ostile del lume intestinale.

Le sIgA colonizzano così il muco intestinale, il tratto respiratorio, l'apparato urogenitale e i fluidi esocri quali **saliva, lacrime e colostro/latte materno** (garantendo l'immunità passiva neonatale contro i patogeni enterici).

Funzioni Effettrici delle sIgA

Le sIgA operano secondo una strategia immunologica unica definita **Esclusione**

Immunitaria:

- **Assenza di Flogosi:** La funzione primaria della sIgA è legarsi stericamente a virus, batteri e tossine luminali impedendo il loro attracco (adesione) ai recettori dell'epitelio dell'ospite. Le sIgA aggregate vengono poi rimosse meccanicamente dal flusso del muco o dalla peristalsi.
- **Mancata attivazione del complemento:** A differenza delle IgG e delle IgM, le sIgA **non possiedono il sito di legame per il C1q**, risultando del tutto incapaci di attivare la via classica del complemento. Questa apparente limitazione è in realtà un cruciale vantaggio evolutivo: se gli anticorpi luminali attivassero costantemente il complemento contro i trilioni di batteri del microbiota commensale, si verificherebbe una distruzione infiammatoria cronica e catastrofica dell'epitelio intestinale.
- **Neutralizzazione Intracellulare ed Esocitosi:** Durante il loro viaggio transcitoico, le IgA possono intercettare e neutralizzare i virioni in fase di replicazione all'interno dei compartimenti endosomiali epiteliali, esportandoli all'esterno durante l'esocitosi apicale.
- **Interazione con FcαRI (CD89):** Qualora un patogeno riesca a superare la barriera epiteliale penetrando nella lamina propria, viene intercettato dalle IgA locali. Il complesso immune attiva il recettore **FcαRI (CD89)** espresso su neutrofili, macrofagi ed eosinofili, scatenando una potente fagocitosi e il burst respiratorio per eradicare l'invasione tissutale.

2. Immunoglobuline E (IgE): Concentrazione, Recettori e Ruoli Biologici

Se le IgA dominano quantitativamente la scena immunitaria, le IgE rappresentano l'estremo opposto: l'isotipo più raro, strettamente regolato e potenzialmente letale.

Concentrazione Precisa nel Siero

In un individuo sano e non atopico, la concentrazione sierica delle IgE è estremamente bassa, oscillando tra i **0.05 e i 0.3 $\mu\text{g/mL}$** (equivalenti a circa **20 - 100 UI/mL**). Per fare un paragone cinetico e quantitativo, le IgG fluttuano a circa 12 mg/mL: le IgE sono quindi presenti in tracce infinitesimali, rappresentando meno dello **0.001%** del pool immunoglobulinico circolante.

Possiedono un'emivita plasmatica ridottissima (circa 2 giorni), ma la loro persistenza biologica reale è lunghissima (settimane o mesi) poiché si sequestrano quasi istantaneamente fuori dal circolo, ancorandosi saldamente ai tessuti tramite i loro recettori ad alta affinità.

I Recettori per le IgE

Le funzioni delle IgE sono interamente veicolate da due recettori di superficie dotati di affinità e strutture divergenti:

1. **FcεRI (Recettore ad Alta Affinità - $K_d \approx 10^{-10}$ - M):**

- *Struttura:* È un complesso tetramerico composto da una catena α (responsabile del legame con il dominio C₃ dell'IgE), una catena β (con quattro domini transmembrana, amplificatrice del segnale) e un omodimero di catene γ unite da ponti disolfuro. I domini citoplasmatici delle catene β e γ contengono i motivi **ITAM** (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*).
- *Distribuzione e Funzione:* Espresso costitutivamente a densità massimali sulla membrana di **mastociti e basofili** (e in forma trimerica $\alpha\gamma_2$ sulle cellule dendritiche e sugli eosinofili). Data la sproporzionata affinità di legame, FcεRI cattura le IgE monomeriche libere nel siero anche a concentrazioni infinitesimali, rivestendo stabilmente la superficie dei mastociti tissutali.

2. **FcεRII / CD23 (Recettore a Bassa Affinità - $K_d \approx 10^{-7}$ - M):**

- *Struttura:* Strutturalmente non appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline, ma è una lectina di tipo C (dipendente dal calcio) che esiste sia in forma trimerica di membrana sia in forma solubile clivata proteoliticamente.
- *Distribuzione e Funzione:* Espresso su linfociti B, macrofagi e cellule follicolari dendritiche. Svolge un ruolo di feedback omeostatico regolando la sintesi stessa delle IgE da parte dei linfociti B e cooperando nel trasporto transepiteliale dei complessi immuni.

Ruolo Fisiologico: La Difesa Antiparassitaria (ADCC)

Il fine evolutivo per cui il sistema immunitario mantiene un isotipo così pericoloso è la protezione contro i macroparassiti extracellulari, in particolare gli **elminti** (*Schistosoma*, *Trichinella*, *Nematodi*), organismi troppo voluminosi per essere fagocitati.

- Sotto la spinta della risposta polarizzata Th2, i linfociti B producono IgE specifiche che opsonizzano (rivestono) la cuticola esterna del verme.
- Gli **eosinofili** reclutati in loco dall'IL-5 ingaggiano le regioni Fc delle IgE tramite i loro recettori di superficie.
- Questo legame ravvicinato innesca la **Citotossicità Cellulare Anticorpo-Dipendente (ADCC)**: l'eosinofilo esocita il contenuto dei suoi granuli elettrondensi direttamente sul parassita, rilasciando la **Proteina Basica Maggiore (MBP)** e la **Proteina Cationica degli Eosinofili (ECP)**, sostanze chimiche altamente distruttive capaci di perforare e lere il tegumento dell'elminto fino a provocarne la necrosi e la morte.

Ruolo Patologico: L'ipersensibilità di Tipo I (Atopia e Anafilassi)

Nei soggetti geneticamente predisposti (atopici), il sistema immunitario risponde erroneamente a sostanze ambientali innocue (allergeni come pollini, acari della polvere, veleno d'imenotteri o proteine alimentari) attivando l'asse Th2 e inducendo una sintesi sregolata di IgE specifiche. Questo assetto patologico si articola in due fasi biochimiche distinte:

1. **Fase di Sensibilizzazione (Silente):** Le IgE prodotte entrano in circolo e vanno a saturare i recettori FcεRI espressi sulla membrana dei mastociti residenti nei tessuti di frontiera (cute, apparato respiratorio, gastrointestinale). In questa fase il paziente non manifesta alcun sintomo; i suoi mastociti sono ora armati e trasformati in "bombe a orologeria" immunologiche.
2. **Fase di Scatenamento (Riesposizione):** Al successivo incontro con il medesimo allergene, quest'ultimo penetra nei tessuti e si lega alle IgE già ancorate ai recettori FcεRI dei mastociti. Affinché il segnale biochimico si attivi, l'allergene (che deve essere multimerico o polivalente) deve legare contemporaneamente almeno due IgE adiacenti, inducendo il **cross-linking (legame crociato)** dei recettori FcεRI.

Cascata Molecolare della Degranolazione Mastocitaria:

- Il cross-linking dei recettori provoca il ravvicinamento spaziale delle code citoplasmatiche e l'attivazione della tirosina-chinasi **Lyn**, la quale fosforila i residui tirosinici dei motivi **ITAM** delle catene β e γ.
- Gli ITAM fosforilati reclutano la chinasi **Syk**, che attiva a cascata la Fosfolipasi C-γ (PLCγ).
- La PLCγ idrolizza i fosfolipidi di membrana generando Inositolo trifosfato (IP3) e Diacilglicerolo (DAG).
- L'IP3 induce un massiccio e istantaneo rilascio di **Ioni Calcio (-Ca²⁺-)** dai depositi del reticolo endoplasmatico lisoso-mucosale. L'impennata del calcio intracellulare forza la fusione delle membrane dei granuli preformati con la membrana plasmatica del mastocita, esocitando in pochi minuti il loro contenuto nel tessuto circostante.

I Mediatori Rilasciati e Correlazione Clinica:

- **Mediatori Preformati Immediati:** Viene liberata **istamina** (che legandosi ai recettori H1 vascolari induce vasodilatazione, iperpermeabilità capillare ed edema, responsabili del ponfo e del prurito), unitamente a eparina e proteasi neutre (triptasi e chimasi) che degradano la matrice extracellulare.
- **Mediatori Lipidici de Novo (dopo 10-20 minuti):** L'attivazione della Fosfolipasi A2 (PLA2) avvia il metabolismo dell'acido arachidonico, portando alla sintesi dei **Leucotrieni LTC4, LTD4, LTE4** (noti storicamente come SRS-A, capaci di indurre una broncocostrizione 1000 volte più potente dell'istamina e ipersecrezione di muco nell'asma) e della **Prostaglandina D2 (PGD2)** (potente induttore di chemiotassi e vasodilatazione).
- **Fase Tardiva (dopo 2-8 ore):** I mastociti avviano la trascrizione genica e la secrezione di citochine pro-infiammatorie (TNF-α, IL-4, IL-5, IL-13) che richiamano massicciamente neutrofili ed eosinofili nel sito, cronicizzando il danno tissutale (fase tardiva dell'asma e della dermatite).

Se la degranolazione mastocitaria rimane localizzata, avremo manifestazioni cliniche circoscritte quali l'**asma bronchiale**, la **rinite allergica** o l'**orticaria**. Se l'allergene penetra direttamente nel circolo ematico (es. farmaci per via endovenosa o veleno di vespa), la degranolazione diventa sistemica e simultanea in tutti i distretti vascolari: il crollo drammatico delle resistenze periferiche e lo stravasamento massivo di liquidi determinano l'apocalittico shock ipovolemico e ostruttivo noto come **Shock Anafilattico**, l'emergenza medica medica salvabile unicamente tramite la somministrazione immediata di adrenalina.

6. Immunopatologia e Ipersensibilità

Candidato, affrontiamo questi quesiti esplorando a fondo le basi molecolari dell'immunopatologia, dalle deficienze congenite alle risposte aberranti di ipersensibilità. Il

livello di dettaglio sarà commisurato a quello di una discussione di tesi o di un esame magistrale avanzato.

1. La Malattia Granulomatosa Cronica (MGC) e il Complesso NADPH Ossidasi

La **Malattia Granulomatosa Cronica (MGC)** è un'immunodeficienza primaria congenita a carico dell'immunità innata, specificamente dei fagociti (neutrofili, monociti e macrofagi). Dal punto di vista clinico, i pazienti sono afflitti da infezioni batteriche e fungine ricorrenti e letali, sostenute esclusivamente da microrganismi **catalasi-positivi** (come *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus spp.*, *Burkholderia cepacia*). L'incapacità dei macrofagi di debellare il patogeno fagocitato porta al sequestro dello stesso all'interno di strutture infiammatorie croniche, i **granulomi**.

Il Difetto Molecolare: L'enzima NADPH Ossidasi

Il cuore patogenetico della MGC è il malfunzionamento del complesso della **NADPH ossidasi fagocitica**, l'enzima responsabile del *burst ossidativo* (esplosione respiratoria). In condizioni fisiologiche, questo complesso si assembla sulla membrana del fagosoma e trasferisce elettroni dal citosol (donati dal NADPH) all'ossigeno molecolare ($-O_2-$) all'interno del lume fagosomiale, generando l'anione superossido ($-O_2^{\cdot-}$) e le successive Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS, come il perossido di idrogeno $-H_2O_2-$ e l'acido ipocloroso $-HOCl-$, veri e propri "candeggianti" biologici).

Senza ROS, il microbo sopravvive serenamente all'interno del fagosoma. (I batteri catalasi-negativi, come gli Streptococchi, producono essi stessi $-H_2O_2-$ come scarto metabolico, che il fagosoma difettoso sfrutta per ucciderli; i batteri catalasi-positivi distruggono il proprio $-H_2O_2-$, rendendo la cellula difettosa totalmente inerme).

Il complesso è formato da diverse subunità. La mutazione di gran lunga più frequente (circa il 70% dei casi) è a trasmissione **X-linked recessiva** e colpisce il gene *CYBB*, che codifica per la proteina transmembrana **gp91phox** (glicoproteina 91 kD, subunità catalitica maggiore che insieme alla p22phox forma il citocromo $-b_{558}-$). Le mutazioni a carico delle altre subunità citosoliche regolatrici (p47phox, p67phox) generano varianti autosomiche recessive meno frequenti.

I Test Diagnostici (Valutazione funzionale del Burst Ossidativo)

Poiché il numero di neutrofili nel paziente con MGC è normale (se non elevato per l'infiammazione), la diagnosi non è quantitativa ma **funzionale**.

1. **Test NBT (Nitroblu di Tetrazolio):** È il test classico e qualitativo. L'NBT è un colorante giallo pallido solubile. Se i neutrofili del paziente sono sani e producono anione superossido, l'NBT viene chimicamente ridotto precipitando sotto forma di **formazano, cristalli insolubili di un blu-nerastro intenso** visibili al microscopio ottico all'interno delle cellule. Nel paziente con MGC l'NBT non viene ridotto e le cellule restano incolori/chiare. Le madri portatrici sane della mutazione X-linked mostreranno una popolazione mista (mosaicismo del cromosoma X).
2. **Test Phagoburst (Citofluorimetria con Diidrorodamina - DHR 123):** È l'esame gold standard moderno, quantitativo e ad altissima sensibilità. Utilizza la DHR-123, una sonda originariamente non fluorescente. Il campione di sangue intero viene stimolato artificialmente con **PMA (Forbolo miristato acetato)**, un potente attivatore chinasi della NADPH ossidasi.
 - *Soggetto sano:* I ROS prodotti ossidano la DHR-123 trasformandola in **Rodamina 123**, altamente fluorescente. Il citofluorimetro registrerà un massiccio e netto spostamento (shift) del picco cellulare verso l'estrema

destra sull'asse della fluorescenza (canale FL1).

- *Paziente MGC*: Assenza totale di ossidazione. Il picco citofluorimetrico rimane fermo a ridosso dell'asse Y (negativo), sovrapponibile a quello dei neutrofili non stimolati.

2. Immunodeficienza Combinata Grave (SCID)

Sotto l'acronimo SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) si raggruppa l'apice più drammatico e letale dei difetti genetici del sistema immunitario (spesso noti mediaticamente come "sindrome dei bambini bolla").

L'aggettivo "**Combinata**" indica la compromissione simultanea sia del compartimento T-cellulare sia di quello B-cellulare (e talvolta NK). Tuttavia, il difetto primario e dirimente risiede sempre nello sviluppo o nell'attivazione dei **Linfociti T**. La compromissione B-cellulare (assenza di anticorpi) è un gravissimo effetto secondario obbligato: senza il cruciale "help" dei linfociti T CD4+ (segnali CD40-CD40L e citochine), i linfociti B non possono attivarsi, né formare centri germinativi, né attuare lo switch isotipico, rendendo l'immunità umorale non funzionale.

Senza intervento (Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche o Terapia Genica), questi infanti soccombono nei primissimi mesi di vita a causa di infezioni virali e fungine opportunistiche gravissime (es. *Pneumocystis jirovecii*, Candidosi sistemica).

- *Forma più comune (X-linked SCID)*: Mutazione della **catena - γ - comune (- γ _c- o CD132)**, una subunità condivisa dai recettori di ben sei interleuchine vitali (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21). Mancando l'asse IL-7, la maturazione T nel timo si arresta (Fenotipo T- B+ NK-).
- *Deficit di ADA (Adenosina Deaminasi)*: L'assenza di questo enzima causa l'accumulo catastrofico di metaboliti tossici (dATP) nel citosol, che mandano in apoptosi precoce i progenitori linfoidi.
- *Sindrome di Omenn (Mutazione RAG)*: Assenza delle ricombinasi RAG1/RAG2, impedendo totalmente il riarrangiamento genico dei recettori TCR e BCR (Fenotipo T- B- NK+).

3. Classificazione delle Ipersensibilità secondo Gell e Coombs

Questa schematizzazione del 1963 categorizza le reazioni immunologiche dannose in base al braccio effettore coinvolto e alle tempistiche cliniche:

- **Tipo I (Ipersensibilità Immediata o Anafilattica)**: Mediata dalle **IgE** e dalla degranolazione di mastociti e basofili. Insorge in minuti (Es. Asma allergico, Rinite, Shock Anafilattico).
- **Tipo II (Ipersensibilità Citotossica Anticorpo-mediata)**: Mediata da anticorpi **IgG e IgM** che riconoscono erroneamente antigeni presenti *sulla superficie di cellule intatte* o della matrice extracellulare. Causano distruzione cellulare via attivazione del Complemento, Opsonizzazione o ADCC mediata da NK/Macrofagi. (Es. Reazioni trasfusionali emolitiche, Malattia Emolitica del Neonato, Sindrome di Goodpasture).
- **Tipo III (Ipersensibilità da Immunocomplessi)**: Mediata da complessi antigene-anticorpo (IgG/IgM e **antigeni solubili circolanti**) che sfuggono alla clearance e precipitano nel letto endoteliale di vasi, glomeruli renali o sinovie articolari. Lì attivano ferocemente il complemento richiamando neutrofili che causano necrosi fibrinoide. (Es. Lupus Eriteamto Sistemico - LES, Malattia da Siero, Artrite Reumatoide).
- **Tipo IV (Ipersensibilità Ritardata o Cellulo-mediata)**: Non vi sono anticorpi coinvolti. È mediata unicamente dai **Linfociti T** (Th1/Th17 che attivano i macrofagi, o

CD8+ citotossici). Ha una cinetica lenta (48-72 ore) necessaria per l'espansione e migrazione clonale nel tessuto. (Es. Dermatite da contatto da nichel, Test alla Tuberculina, Sclerosi Multipla).

4. Dettaglio delle Ipersensibilità di Tipo I: IgE, Asma e Test Allergologici

L'ipersensibilità di Tipo I (Atopia) rappresenta una risposta aberrante e asimmetrica verso allergeni ambientali innocui, dominata in modo sregolato dall'asse Th2.

Il Meccanismo e il Ruolo delle IgE

Il processo patofisiologico si articola in due tappe sequenziali e temporalmente staccate:

1. **Fase di Sensibilizzazione (Primaria e Silente):** Alla prima esposizione, le cellule dendritiche presentano l'allergene ai linfociti T, polarizzandoli in **Th2**. I Th2 secernono **IL-4** e **IL-13**, le quali inducono nei linfociti B un *class switch recombination* (CSR) estremo verso l'isotipo **IgE**. Queste IgE specifiche lasciano il linfonodo e, grazie all'affinità molecolare ancorano quasi irreversibilmente al loro recettore ad alta affinità **FcεRI**, espresso in modo costitutivo e ad altissima densità sulla membrana dei **mastociti** nei tessuti di confine (cute, polmoni) e sui basofili circolanti. Il paziente è ora "sensibilizzato", sebbene clinicamente asintomatico.
2. **Fase Effettrice di Scatenamento:** A un'esposizione successiva, l'allergene multimerico penetra il tessuto e si lega contemporaneamente a due o più IgE adiacenti ancorate sul mastocita, generando il **cross-linking (legame crociato)** dei recettori **FcεRI**. Questo evento meccanico avvicina i motivi ITAM endocellulari, attivando le chinasi Lyn e Syk, che a cascata scatenano l'influsso massiccio di ioni Ca^{2+} . L'impennata del calcio forza la **degranolazione esplosiva ed esocitotica**: il mastocita vomita in pochi secondi istamina, triptasi ed eparina, iniziando contestualmente a sintetizzare ex-novo mediatori lipidici letali (leucotrieni LTC4/LTD4 derivati dall'acido arachidonico).

L'Asma Bronchiale

L'asma è la manifestazione clinica più complessa del Tipo I a livello dell'albero respiratorio inferiore. Si divide in:

- **Fase Precoce (Minuti):** L'istamina e, soprattutto, i neo-sintetizzati **Leucotrieni (SRS-A)** causano una broncocostrizione massiva della muscolatura liscia, associata ad edema vascolare sub-mucosale, generando il sibilo e la dispnea ostruttiva acuta.
- **Fase Tardiva (Ore/Giorni):** Il mastocita inizia a trascrivere citochine pro-infiammatorie, tra cui l'**IL-5**. L'**IL-5** è il richiamo specifico per gli **eosinofili**. Infiltrando i bronchi, gli eosinofili rilasciano proteine tossiche (MBP, ECP) distrutturando l'epitelio ciliato. L'**IL-13** induce la metaplasia delle cellule mucipare, portando all'ostruzione da tappi di muco denso e favorendo il rimodellamento fibrotico irreversibile delle vie aeree.

Test Diagnostici Allergologici

L'allergologia moderna accerta l'atopia tracciando direttamente o indirettamente queste IgE e i loro effettori cellulari.

- **Prick Test (In vivo, di primo livello):** Si depongono gocce di estratti allergenici sull'avambraccio e si punge leggermente lo strato corneo con una lancetta monouso. Se il paziente possiede mastociti cutanei già "armati" con IgE specifiche per quell'estratto, il cross-linking avverrà in vivo. In 15 minuti l'istamina rilasciata causerà vasodilatazione (eritema rosso) e stravasamento di plasma capillare, formando il caratteristico rigonfiamento sieroso detto **ponfo**.
- **RAST (RadioAllergoSorbent Test) / Dosaggio IgE Specifiche:** Indagine *in vitro*

eseguita su prelievo ematico. Attraverso tecniche di chemiluminescenza o fluoroimmunosaggio, quantifica numericamente i livelli sierici di IgE libere circolanti reattive contro specifici allergeni molecolari, fornendo la reale portata della sensibilizzazione senza alcun rischio di indurre shock anafilattico nel paziente.

- **Basotest / BAT (Basophil Activation Test):** Eseguito *in vitro* in citofluorimetria. Il sangue intero del paziente viene cimentato in provetta con l'allergene vivo. Se avviene la reazione allergica, i basofili del sangue si attiveranno degranulando, e per farlo esporranno sulla propria membrana proteine che prima erano nascoste dentro le vescicole (come il marker **CD63** o il **CD203c**). L'evidenza fluorimetrica di basofili intensamente CD63+ convalida una diagnosi di grave reattività cellulo-mediata dal recettore IgE.

1. Ipersensibilità di Tipo II (Citotossica) e Dinamiche Trasfusionali

Nelle reazioni di Tipo II, il danno tissutale è orchestrato da anticorpi (principalmente **IgG** e **IgM**) che si legano ad antigeni intrinseci o estrinseci (es. farmaci adsorbiti) localizzati **direttamente sulla superficie di cellule intatte o sulla matrice extracellulare**.

Meccanismi effettori del danno:

1. **Lisi mediata dal Complemento:** L'anticorpo legato attiva la via classica (C1q), culminando nel Complesso di Attacco alla Membrana (MAC) e nella lisi osmotica.
2. **Oponizzazione e Fagocitosi:** I frammenti C3b del complemento e la regione Fc degli anticorpi (riconosciuta dai recettori FcγR sui macrofagi splenici o epatici) opsonizzano la cellula, portandola alla fagocitosi.
3. **Citotossicità Cellulare Anticorpo-Dipendente (ADCC):** Le cellule NK riconoscono le IgG legate al bersaglio tramite il recettore CD16 e rilasciano perforine/granzimi.
4. **Disregolazione Recettoriale:** Gli anticorpi legano recettori cellulari alterandone la funzione senza uccidere la cellula (es. anticorpi stimolanti il recettore TSH nel *Morbo di Basedow-Graves*, o inibenti il recettore dell'acetilcolina nella *Miastenia Gravis*).

Applicazione Clinica: Incompatibilità Trasfusionale (AB0 vs Rh)

Il rigetto acuto di una trasfusione è il prototipo assoluto del Tipo II, ma le dinamiche biochimiche variano drasticamente a seconda del sistema sanguigno coinvolto:

- **Sistema AB0 (Emolisi Intravascolare dominata dalle IgM):** Gli antigeni A e B sono di natura *glicidica*. Il sistema immunitario produce anticorpi naturali (isoemoagglutinine) contro l'antigene mancante a causa del continuo cross-reattivo con i batteri intestinali. Questi anticorpi sono di isotipo **IgM**. Essendo pentameriche, le IgM possiedono un'avidità immensa e siti multipli per il legame simultaneo con il **C1q**. Se si trasfonde sangue incompatibile (es. sangue A in un soggetto 0), le IgM del ricevente agglutinano istantaneamente i globuli rossi del donatore e attivano il complemento in modo esplosivo. Il MAC distrugge l'eritrocita direttamente nel torrente circolatorio (**emolisi intravascolare**), liberando emoglobina libera che intasa i tubuli renali, scatenando insufficienza renale acuta, coagulazione intravascolare disseminata (CID) e shock.
- **Sistema Rh (Emolisi Extravascolare dominata dalle IgG):** L'antigene Rh(D) è una *proteina* transmembrana. Non esistono anticorpi naturali; un soggetto Rh- deve prima essere sensibilizzato (es. precedente trasfusione o gravidanza di feto Rh+). Gli anticorpi prodotti sono di isotipo **IgG**. Le IgG sono meno efficienti delle IgM nell'attivare il complemento (servono due molecole di IgG vicine per legare il C1q). Pertanto, i globuli rossi opsonizzati dalle IgG passano illeso nel circolo arterioso, ma

quando transitano nei sinusoidi della **milza**, i macrofagi splenici li intercettano tramite i recettori FcγRI e li fagocitano (**emolisi extravascolare**). Questo causa ittero grave, ma raramente lo shock fulmineo del mismatch ABO. Inoltre, essendo monomeriche, le IgG attraversano la placenta (mediante FcRn), causando la *Malattia Emolitica del Neonato*.

2. Ipersensibilità di Tipo III (da Immunocomplessi)

A differenza del Tipo II (dove l'antigene è fisso sulla cellula), nel Tipo III l'antigene è **solubile e fluttuante nel plasma**. Quando le IgG/IgM legano questo antigene, formano micro-aggregati molecolari noti come **immunocomplessi**.

Fisiologicamente, gli immunocomplessi vengono opsonizzati dal complemento, agganciati ai recettori CR1 degli eritrociti e trasportati al fegato e alla milza per lo smaltimento (sistema dei fagociti mononucleati).

Se però vi è un eccesso persistente di antigene (es. infezioni croniche, autoantigeni nucleari persistenti, o somministrazione massiva di sieri eterologhi), si formano immunocomplessi di dimensioni intermedie che sfuggono alla clearance.

La Patogenesi Vascolare:

Questi complessi circolano finché, per motivi emodinamici (alta pressione idrostatica, turbolenza), non **precipitano e si incastrano** sotto l'endotelio dei letti capillari filtranti: tipicamente **glomeruli renali, sinovie articolari e derma**.

1. La precipitazione attiva massicciamente il complemento.
2. Si generano grandi quantità di anafilotossine e fattori chemiotattici (**C3a, C5a**).
3. Questi richiamano ondate di **neutrofili**.
4. I neutrofili tentano di fagocitare gli immunocomplessi intrappolati nella membrana basale del vaso, ma non vi riescono ("*fagocitosi frustrata*").
5. I neutrofili esocitano i loro granuli litici e specie reattive dell'ossigeno direttamente sul tessuto vascolare, causando una devastante **vasculite con necrosi fibrinoide** (es. *Lupus Eriteamatoso Sistemico - LES, Malattia da Siero*).

3. Ipersensibilità di Tipo IV, Granuloma Tuberculare e Patogenesi della TBC

L'ipersensibilità di Tipo IV (Ritardata) è l'unica **indipendente dagli anticorpi** e puramente cellulo-mediata. Richiede 48-72 ore affinché i linfociti T specifici della memoria migrino nel sito di esposizione all'antigene, si espandano e si attivino.

Il Modello della Tuberculosis (TBC) e il Granuloma:

L'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* rappresenta il capolavoro patogenetico in cui il Tipo IV si manifesta come una "spada a doppio taglio" tra protezione e distruzione tissutale.

1. **Infezione Iniziale:** Il micobatterio viene inalato e fagocitato dai macrofagi alveolari. Tuttavia, tramite lipidi della sua parete clinica (es. LAM), inibisce la fusione fago-lisosomiale, replicandosi indisturbato dentro i macrofagi.
2. **Attivazione Adattativa:** Le cellule dendritiche migrano ai linfonodi e presentano gli antigeni micobatterici ai linfociti T CD4+, polarizzandoli verso il fenotipo **Th1** (via IL-12).
3. **Innesco del Tipo IV:** I linfociti Th1 tornano nel polmone e secernono massicce dosi di **IFN-γ**. L'IFN-γ sovra-regola ferocemente l'attività macrofagica (Burst ossidativo aumentato, iperpressione di MHC-II).
4. **Formazione del Granuloma:** Poiché il batterio resiste all'eradicazione rapida, l'infiammazione cronicizza. Il sistema immunitario attua una strategia di **contenimento strutturale**. I macrofagi iperattivati si trasformano in *cellule epitelioidi*

(che si incastrano tra loro come mattoni) e si fondono a formare le *cellule giganti multinucleate di Langhans*. Una fitta corona di linfociti T e fibroblasti circonda questo nucleo, sigillando fisicamente i micobatteri ("tubercolo").

5. **Danno Tissutale (Necrosi Caseosa):** Con il protrarsi della risposta Th1, gli enzimi idrolitici rilasciati dai macrofagi e l'attività citotossica dei cloni CD8+ portano a necrosi colliquativa-coagulativa del tessuto polmonare centrale del granuloma, nota come **necrosi caseosa** (per l'aspetto simile a formaggio fuso). Questo materiale necrotico distrugge l'architettura polmonare (causando le tipiche caverne polmonari e l'emottisi), rendendo l'immunità stessa la causa primaria dei sintomi devastanti della malattia.

4. Meccanismi dell'Autoimmunità e Ruolo delle Cellule NK

L'autoimmunità deriva dal collasso (rottura) della **tolleranza immunologica** (centrale o periferica), in cui cloni linfocitari B o T riconoscono gli auto-antigeni del self come non-self, innescando danni cronici.

Meccanismi di Base:

L'eziologia è sempre multifattoriale, basata sull'incrocio tra **genetica ed ambiente**:

- **Suscettibilità Genetica:** Polimorfismi nei geni **HLA** (es. HLA-B27 nella Spondilite Anchilosante, HLA-DR4 nell'Artrite Reumatoide) che presentano auto-peptidi con un'efficienza anomala; difetti genetici in *AIRE* (APECED), *FoxP3* (IPEX, deficit Treg) o difetti dei meccanismi apoptotici (Fas/FasL, ALPS).
- **Fattori Ambientali (Trigger infettivi):**
 - **Mimetismo Molecolare (Molecular Mimicry):** I patogeni (es. *Streptococco beta-emolitico*) esprimono antigeni peptici quasi identici a strutture self (es. miocardio). Gli anticorpi anti-streptococco cross-reagiscono distruggendo il cuore (Febbre Reumatica).
 - **Espansione dell'Epitopo (Epitope Spreading):** Danni tissutali virali rilasciano antigeni intracellulari criptici, normalmente invisibili al sistema immunitario, che innescano un'onda secondaria di auto-reattività.
 - **Attivazione Bystander:** Un'intensa infiammazione (citochine virali) attiva aspecificamente APC locali che espongono antigeni self, fornendo costimolazione a cloni T autoreattivi dormienti.

Il Coinvolgimento delle Cellule NK:

Le cellule Natural Killer presentano un comportamento duale o paradossale nelle malattie autoimmuni:

- **Ruolo Protettivo (Omeostatico):** Fisiologicamente, le NK uccidono (via perforina) i linfociti T e le cellule dendritiche eccessivamente attivati, contribuendo a spegnere ("contrarre") la risposta immunitaria. Se le NK sono deficitarie, i T autoreattivi proliferano indisturbati (come accade nella Sclerosi Multipla).
- **Ruolo Patogenetico:** Al contrario, nei microambienti infiammatori, le NK secernono fiumi di IFN- γ e TNF- α che alimentano il fuoco autoimmune (polarizzazione Th1). Inoltre, se ci sono auto-anticorpi IgG che legano i tessuti (es. Lupus), le NK si agganciano ad essi tramite il CD16 scatenando un disastroso danno tissutale via ADCC.

5. Linfoistocitosi Emofagocitica (HLH)

La **Linfoistocitosi Emofagocitica (HLH)** è una sindrome iperinfiammatoria catastrofica e spesso fatale, generata da un difetto paralizzante e controintuitivo del sistema immunitario: **l'incapacità funzionale delle cellule citotossiche (NK e linfociti T CD8+) di uccidere i**

propri bersagli.

La Patogenesi del Loop Citochinico:

1. **Il difetto:** Può essere primario (mutazioni genetiche familiari nei geni della degranolazione, es. gene della perforina *PRF1*) o secondario (acquisito a causa di infezioni virali soverchianti, tipicamente il virus di Epstein-Barr, EBV).
2. **L'assenza di Contrazione:** Di fronte al virus, le cellule CD8+ e NK si attivano e proliferano, ma a causa del difetto biochimico, non riescono a lisare la cellula infettata. Non essendoci l'eliminazione dell'antigene (la sorgente dello stimolo non si spegne mai), i linfociti T continuano a stimolarsi in un loop di feedback positivo.
3. **La Tempesta Citochinica:** Questo "esercito frustrato" inonda il plasma di quantitativi apocalittici di **IFN- γ** .
4. **L'Emofagocitosi:** L'IFN- γ iper-attiva i macrofagi in tutto il sistema reticolo-endoteliale (midollo osseo, fegato, milza). Questi macrofagi "impazziti" iniziano a fagocitare brutalmente e cannibalizzare le cellule ematopoietiche sane del paziente: inglobano eritrociti vitali, leucociti e piastrine (fenomeno patognomonico dell'emofagocitosi visibile all'aspirato midollare).

Clinica: Il quadro degenera in pochi giorni con febbre persistente, epato-splenomegalia massiva, pancitopenia severa, iperferritinemia (>10.000 $\mu\text{g/L}$), e disfunzione multiorgano dovuta al collasso infiammatorio endoteliale. La sopravvivenza è legata unicamente a chemio-immunosoppressione tempestiva seguita da trapianto di midollo osseo.

7. Tecniche, Patologia Generale e Oncologia

1. Funzionamento e Componenti Fisiche del Citofluorimetro

Il citofluorimetro si compone di tre sistemi fisici perfettamente integrati:

1. **Il Sistema Fluidico:** Il suo scopo è prendere una complessa miscela cellulare (es. sangue intero lisato) e costringere le cellule a passare **una alla volta** (in singola fila) attraverso il raggio laser. Questo si ottiene tramite il principio della *focalizzazione idrodinamica*: il campione viene iniettato in un fluido di trasporto (sheath fluid) che viaggia a pressione maggiore, comprimendo il flusso del campione al centro e allineando le cellule come perle su un filo.
2. **Il Sistema Ottico:** Comprende le fonti di eccitazione (uno o più laser a lunghezze d'onda specifiche, es. blu 488 nm, rosso 633 nm) e un complesso labirinto di lenti, specchi diecrici e filtri ottici (passa-banda, passa-lungo, passa-corto). I filtri separano fisicamente i fotoni in base alla loro lunghezza d'onda, indirizzandoli verso i sensori corretti ed evitando sovrapposizioni di segnale.
3. **Il Sistema Elettronico:** È costituito dai **Fotomoltiplicatori (PMT)** e dai fotodiodi. Questi sensori captano i fotoni (sia la luce diffusa che la fluorescenza emessa dai fluorocromi coniugati agli anticorpi) e li convertono in segnali elettrici proporzionali. Un convertitore analogico-digitale (ADC) traduce infine questi impulsi in dati numerici elaborabili dal software.

I Parametri Fisici: FSC (Forward Scatter) e SSC (Side Scatter)

Ancor prima di analizzare la fluorescenza (i marcatori specifici), il raggio laser che colpisce la cellula subisce una diffrazione fisica che ci fornisce l'identikit morfologico della cellula stessa:

- **FSC (Forward Scatter - Diffusione in Avanti):** Misura la luce che viene deviata di pochissimi gradi (solitamente lungo lo stesso asse del laser). L'intensità del segnale

FSC è direttamente proporzionale al **volume (dimensione)** della cellula. Una cellula grande produrrà un'ombra (diffrazione) maggiore rispetto a una piccola.

- **SSC (Side Scatter - Diffusione Laterale):** Misura la luce che viene riflessa o rifratta a un angolo di **90 gradi** rispetto al laser. Il segnale SSC quantifica la **complessità interna e la granularità** della cellula. Molti granuli citoplasmatici o un nucleo molto lobato causeranno un'elevata rifrazione laterale della luce.

Applicazione pratica (Il "Morfogramma" Leucocitario):

Se incrociamo questi due parametri su un grafico cartesiano (Dot Plot: FSC sull'asse X, SSC sull'asse Y) analizzando il sangue periferico, distinguiamo immediatamente tre popolazioni assolute senza usare alcun anticorpo:

- **Linfociti:** Piccoli e agranulari: *Basso FSC, Basso SSC.*
- **Monociti:** Più grandi, con citoplasma debolmente complesso: *Medio/Alto FSC, Medio SSC.*
- **Granulociti (Neutrofili/Eosinofili):** Dimensioni medie ma estremamente ricchi di granuli densi e nuclei polilobati: *Medio FSC, Altissimo SSC.*

2. Analisi dei Grafici Citofluorimetrici (Immunofenotipizzazione)

Una volta isolata la popolazione morfologica di interesse (es. i linfociti tramite il "gating" su basso FSC/SSC), si analizzano le proteine di superficie (CD - *Cluster of Differentiation*) utilizzando anticorpi monoclonali fluorescenti.

Caso 1: Popolazione CD16+ / CD56+ / CD3-

Se inquadro una popolazione che esibisce questo specifico assetto immunofenotipico, sto inequivocabilmente osservando le **Cellule Natural Killer (NK)**.

- **CD3 Negativo:** È l'esclusione dirimente. Il CD3 è il co-recettore universale del TCR espresso da *tutti* i linfociti T. La sua assenza esclude che si tratti di un Linfocita T Citotossico convenzionale o di una cellula NKT (Natural Killer T, che sarebbe CD3+ e CD56+).
- **CD56 Positivo:** È una molecola di adesione (NCAM) ed è il marcatore fenotipico classico delle NK. L'intensità della sua espressione divide le NK in *CD56-bright* (produttrici di citochine, localizzate nei linfonodi) e *CD56-dim* (altamente citotossiche, circolanti).
- **CD16 Positivo:** È il recettore a bassa affinità per il frammento Fc delle IgG (FcγRIIIa). Essendo intensamente CD16+, deduco che questo clone è perfettamente equipaggiato per eseguire l'**ADCC** (Citotossicità Cellulare Anticorpo-Dipendente) legandosi a cellule opsonizzate.

Caso 2: Linfociti circolanti CD19+ e CD20-

Il riscontro di cloni cellulari nel sangue venoso periferico che possiedono il CD19 ma mancano del CD20 apre scenari interpretativi ben precisi, basati sull'ontogenesi B:

- **Il CD19** è un marcatore *Pan-B*: si accende nello stadio di pro-B precoce nel midollo osseo e rimane acceso per tutta la vita della cellula.
- **Il CD20** è un canale del calcio che viene espresso solo sui *linfociti B maturi* (naïve e memory) e viene inesorabilmente perso quando la cellula raggiunge lo stadio terminale di differenziazione.

Se trovo questo assetto nel sangue periferico, le deduzioni sono tre:

1. **Fisiologia (Plasmacellule/Plasmablasti):** Sto osservando la frazione differenziata terminale dei linfociti B. Le plasmacellule spengono l'espressione del CD20 per dedicare tutta l'energia trascrizionale alla secrezione anticorpale e al marker CD138.
2. **Patologia (Cellule Pre-B):** Potrebbero essere precursori midollari immaturi

fuoriusciti prematuramente nel circolo periferico (es. in contesti leucemici linfoblastici acuti - LLA).

3. **Deduzione Farmacologica (Terapia Target):** In un contesto clinico moderno, questo profilo è il sigillo patognomonico di un paziente sottoposto a **terapia monoclonale depletiva con Rituximab (o Ocrelizumab)**. Il Rituximab è un anticorpo anti-CD20. Quando somministrato, si lega al CD20 e induce la massiccia distruzione via complemento o ADCC di tutti i linfociti B maturi dell'organismo (per curare linfomi B, artrite reumatoide o sclerosi multipla). Il citofluorimetrista vedrà sparire i cloni CD20+, e le uniche cellule della linea B sopravvissute nel sistema (perché invisibili al farmaco) saranno i precursori immaturi (CD19+ CD20-) e le plasmacellule a lunga vita del midollo (che garantiscono il mantenimento dell'immunità pregressa).

1. La Conclusione dell'Apoptosi: Efferocitosi e Riconoscimento Immunologico

L'apoptosi non si conclude semplicemente con la frammentazione della cellula, bensì con un processo di rimozione attiva, rapida e rigorosamente **non infiammatoria** da parte dei fagociti (macrofagi residenti e cellule dendritiche). Questo processo biologico prende il nome di **Efferocitosi**. Se i corpi apoptotici non venissero eliminati prontamente, andrebbero incontro a necrosi secondaria, rilasciando DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) intracellulari e scatenando infiammazione acuta e autoimmunità.

Il ribaltamento dell'asimmetria lipidica: L'esposizione della Fosfatidilserina (PS)

In una cellula vitale sana, la membrana plasmatica presenta una rigida asimmetria fosfolipidica mantenuta attivamente dall'enzima ATP-dipendente **Flippasi**, che confina i residui di Fosfatidilserina (PS) esclusivamente nel foglietto fosfolipidico citoplasmatico (interno).

Quando si innesca la cascata apoptotica, le caspasi effettrici (in particolare la **Caspasi-3** e la **Caspasi-7**) eseguono due tagli proteolitici cruciali:

1. **Inattivano la flippasi**, bloccando il confinamento interno della PS.
2. **Attivano la Scramblasi** (es. la proteina Xkr8). La scramblasi è un enzima calcio-dipendente che mescola passivamente e disordinatamente i fosfolipidi tra i due foglietti.

Il risultato è l'imponente esposizione di Fosfatidilserina sul foglietto extracellulare. La PS esternalizzata agisce come il più potente segnale universale di **"Eat-me" (Mangiarsi)** per il sistema immunitario innato.

Riconoscimento e Fagocitosi tramite PRR (Pattern Recognition Receptors)

Il fagocita viene prima richiamato sul posto da segnali chemiotattici solubili rilasciati dalla cellula morente (segnali *"Find-me"*, come ATP, Sfingosina-1-fosfato e Frattalchina). Giunto in prossimità, il macrofago riconosce la PS esposta attraverso un complesso e ridondante sistema di recettori di superficie:

1. **Riconoscimento Diretto:** I fagociti esprimono recettori specializzati che legano fisicamente e direttamente la testa polare della Fosfatidilserina. I prototipi sono la famiglia dei recettori **TIM** (es. *TIM-1* e *TIM-4*) e il recettore *BAI1*.
2. **Riconoscimento Indiretto (tramite molecole ponte / opsonine apoptotiche):** Il legame è spesso mediato da proteine solubili presenti nel siero che si attaccano alla PS da un lato e a specifici recettori macrofagici dall'altro.
 - La proteina **MFG-E8** (Lattaderina) si lega alla PS e viene riconosciuta dalle integrine $\alpha_3\beta_3$ e $\alpha_5\beta_5$ del macrofago.
 - Le proteine **Gas6** e **Proteina S** legano la PS e interagiscono con i **Recettori TAM** (Tyro3, Axl, Mer) espressi sulla superficie macrofagica.

L'Esito Immunologico (Tolleranza):

A differenza della fagocitosi di un batterio (che innesca vie pro-infiammatorie NF- κ B), l'ingaggio dei recettori per la PS durante l'efferoцитosis avvia una trasduzione del segnale immunosoppressiva. Il fagocita inibisce la produzione di citochine infiammatorie (come TNF- α e IL-12) e inizia a secernere inondazioni di **TGF- β** e **IL-10**. Questo garantisce che la risoluzione del danno tissutale avvenga nel più totale "silenzio" immunologico, promuovendo la guarigione e bloccando l'insorgere di risposte T auto-reattive.

2. Anticorpi Monoclonali (mAbs) in Ambito Terapeutico

Gli anticorpi monoclonali (mAbs) sono immunoglobuline prodotte in laboratorio identiche tra loro, derivate da un singolo clone di linfocita B ingegnerizzato. Essi sono progettati per legare un singolo epitopo di un antigene specifico con un'affinità assoluta.

Dal punto di vista biotecnologico e per limitarne l'immunogenicità (il rischio che il paziente sviluppi anticorpi contro il farmaco stesso), sono stati progressivamente "umanizzati":

- **Chimerici (-ximab):** Regioni variabili murine (Fab) fuse con la regione costante umana (Fc). Es. *Rituximab*.
- **Umanizzati (-zumab):** Solo le regioni ipervariabili CDR sono di origine murina. Es. *Pembrolizumab*, *Trastuzumab*.
- **Totalmente Umani (-umab):** Prodotti tramite fagi o topi transgenici con locus immunoglobulinico umano. Es. *Adalimumab*.

Meccanismi d'Azione Terapeutica:

1. **Neutralizzazione o Blocco Recettoriale:** L'anticorpo si lega fisicamente al sito attivo di una citochina patogena o al suo recettore, ostruendone il legame. (Esempio: gli *Anti-TNF- α* per bloccare l'infiammazione nell'Artrite Reumatoide, o gli *Anti-PD-1* come Nivolumab per togliere il "freno inibitorio" ai linfociti T in oncologia).
2. **ADCC (Citotossicità Cellulare Anticorpo-Dipendente):** L'anticorpo lega l'antigene sulla superficie di una cellula tumorale. La sua porzione Fc sporgente viene riconosciuta dal recettore **CD16 (Fc γ RIII)** delle cellule Natural Killer (NK) del paziente, inducendo la degranolazione di perforine e l'apoptosi del tumore. (Esempio: il *Rituximab* contro il recettore CD20 nei linfomi a cellule B).
3. **CDC (Citotossicità Complemento-Dipendente):** La regione Fc degli anticorpi adesi al target attiva il C1q e l'intera cascata classica del complemento, lisi osmotica (MAC) della cellula maligna.

4. **Farmaci Immunoconiugati (ADC):** Il monoclonale viene usato come "cavallo di Troia", coniugato chimicamente a una tossina chemioterapica letale o a un radioisotopo. Una volta legato l'antigene, il farmaco viene internalizzato dalla cellula tumorale, liberando il veleno solo ed esclusivamente al suo interno, risparmiando i tessuti sani.

3. Terapia CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cells)

Le **CAR-T cells** rappresentano il vertice assoluto dell'immunoterapia oncologica personalizzata. Si tratta di una terapia genica autologa che trasforma i linfociti T "spettatori" del paziente in spietati "killer in serie" contro le cellule neoplastiche.

Il Limite della Biologia Fisiologica:

Normalmente, i linfociti T del paziente (anche quelli espansi per riconoscere il tumore) sono schiavi della **restrizione MHC**: possono attaccare il tumore *solo se* quest'ultimo espone peptidi mutati sulla molecola MHC. Poiché i tumori down-regolano subdolamente l'MHC di classe I per rendersi "invisibili" al TCR (evasione immunitaria), i linfociti T nativi diventano miopi e inermi.

La Soluzione: La Chimera Recettoriale (CAR)

Si prelevano i linfociti T dal sangue del paziente (leucaferesi) e, in laboratorio, vengono infettati con un vettore virale (es. lentivirus) contenente il gene per un recettore completamente sintetico e chimerico, il **CAR**.

Il CAR unisce il meglio dell'immunità umorale (anticorpi) e cellulare (linfociti T) fondendo domini fisiologicamente separati in un'unica proteina transmembrana:

1. **Dominio Extracellulare (Riconoscimento):** È costituito da un **scFv (single-chain variable fragment)**, ovvero la porzione variabile (il sito di legame Fab) di un anticorpo monoclonale in grado di riconoscere uno specifico antigene tumorale intero di superficie (es. il CD19 espresso nella leucemia linfoblastica acuta). *Cruciale: l'scFv riconosce l'antigene in forma nativa, by-passando totalmente la necessità dell'MHC.*
2. **Dominio Transmembrana:** Ancoraggio alla membrana cellulare del linfocita.
3. **Domini Intracellulari (Attivazione Parossistica):**
 - **Segnale 1:** La porzione citoplasmatica contiene la **catena -zeta- (zeta) del complesso CD3**, ricca di motivi ITAM, che fornisce il segnale primario di attivazione al linfocita appena l'scFv lega il tumore.
 - **Segnale 2 (Co-stimolazione):** Per evitare l'anergia ed esasperare la letalità, nei CAR di seconda e terza generazione vengono fusi artificialmente e in tandem i domini intracellulari di recettori costimolatori come il **CD28** o il **4-1BB (CD137)**.

L'Azione Clinica e i Rischi:

Una volta reinfuse nel paziente, queste "super-cellule" circolano a caccia dell'antigene tumorale (es. CD19). Al primo incontro, l'scFv si lega, e i domini di CD3-zeta- e CD28 scaricano simultaneamente entrambi i segnali di attivazione nel citosol. Il linfocita CAR-T va incontro a una proliferazione esponenziale (*espansione clonale in vivo*) e attacca

chirurgicamente e brutalmente ogni cellula leucemica riversando perforine e granzimi.

L'impatto distruttivo è talmente violento ed efficace che l'effetto collaterale più temibile e comune è la **Sindrome da Rilascio di Citochine (CRS - Tempesta Citochinica)**: la lisi tumorale massiva provoca un rilascio torrenziale di IL-6 e IFN- γ da parte dei macrofagi attivati, portando a shock ipotensivo acuto, che deve essere prontamente gestito somministrando, ironia della sorte, un altro anticorpo monoclonale salvavita: il *Tocilizumab* (anti-recettore dell'IL-6).