

# Caleidoscopio *Italiano*



Adriano Angelucci



## Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate

Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**

# 198

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

# EMERGING INFECTIOUS DISEASES

EID  
Online

A Peer-Reviewed Journal Tracking and Analyzing Disease Trends

Foodborne Disease



Edizione Italiana: Numero 0 - Luglio 2005

Editore:

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

# Caleidoscopio

*Italiano*



Adriano Angelucci

*Università degli Studi dell'Aquila. Facoltà di Medicina e Chirurgia*

## Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate

Direttore Responsabile  
Sergio Rassu

198

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

## ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



**INFORMAZIONI GENERALI.** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

**TESTO.** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

**FRONTESPIZIO.** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) - non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

**BIBLIOGRAFIA.** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2) Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

**TABELLE E FIGURE.** Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

**UNITÀ DI MISURA.** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

**ABBREVIAZIONI.** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

**PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA.** Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviate su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo:

Restless Architect of Human Possibilities sas  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari

## Editoriale

L'Apoptosi è un processo di delezione della cellula estremamente complesso e finemente regolato e costituisce sicuramente un pilastro fondamentale per il mantenimento della omeostasi dell'individuo adulto.

E' ormai stato dimostrato, in maniera inequivocabile, dai numerosi studi effettuati, che l'apoptosi può essere considerata come un "suicidio programmato" ed è parte integrante della maggior parte, se non di tutte le cellule. Questo fenomeno costituisce la risposta cellulare ad una serie di stimoli sia intrinseci che estrinseci alla cellula stessa. Appare sempre più evidente che l'apoptosi gioca un ruolo centrale nella patogenesi di numerose malattie dell'uomo. Per esempio, un aumento dell'apoptosi porta alla perdita di cellule come nelle malattie neurodegenerative, mentre un difetto dell'apoptosi, geneticamente determinato, determina una proliferazione senza controllo delle cellule, tipica del cancro.

Proprio per questo motivo la comprensione del meccanismo dell'apoptosi può costituire una importante chiave di lettura, e quindi di intervento, in numerose malattie. La monografia del dottor Angelucci, costituisce sotto questo punto di vista, una preziosissima fonte di conoscenze proprio perchè, com sottolineato dall'autore, molte delle conoscenze sul processo di apoptosi derivano proprio dagli studi *in vitro* di cellule del sistema immunitario.

Il dott. Adriano Angelucci ha conseguito la Laurea in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi dell'Aquila. Sempre nella stessa Università, si iscrive prima al corso di Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale, successivamente frequenta il laboratorio di Patologia Generale diretto dal Prof. Mauro Bologna dove si occupa dello studio delle metastasi ossee del carcinoma della prostata. Dopo il periodo di servizio civile presso la Comunità di recupero tossicodipendenti "Il Mandorlo" a Catignano (PE), risulta vincitore della Borsa di Studio triennale FIRC per la realizzazione di un progetto di ricerca presso l'Università degli Studi dell'Aquila sugli "aspetti biomolecolari della metastatizzazione ossea nel Carcinoma prostatico". Gli viene quindi conferito il titolo di Dottore di Ricerca in Medicina Sperimentale. Vincitore del Finanziamento Ricerca Giovani Ricercatori presso l'Università degli Studi dell'Aquila, riceve quindi l'affidamento di un incarico di collaborazione dal Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata ed ancora l'affidamen-

to di un incarico di collaborazione dal dipartimento di Biologia di Base ed Applicata dell'Università dell'Aquila per ottenere ancora l'affidamento dell'Assegno di Ricerca per la realizzazione di un progetto di ricerca sulle metastasi ossee e tumori urologici.

Il dottor Angelucci, come si può rilevare da quanto scritto, si è occupato di numerosi aspetti di patologia sperimentale studiando l'espressione delle chinasi ciclina-dipendenti in sistemi cellulari sia normali che tumorali, l'analisi biochimica delle vie molecolari coinvolte nell'arresto proliferativo indotto da farmaci antineoplastici tradizionali e di nuova applicazione, l'analisi delle vie di arresto della proliferazione cellulare rispetto a quelle apoptotiche.

Si è occupato quindi dello studio biochimico/molecolare del carcinoma della prostata con particolare attenzione all'analisi della diagnostica precoce e alla formazione di metastasi ossee, quindi al ruolo delle proteine non collagene della matrice ossea nella progressione del carcinoma prostatico. In particolare si è occupato della messa a punto della tecnica di purificazione di Osteopontina da latte umano e della caratterizzazione degli effetti della matrice extracellulare sulla capacità invasiva di linee cellulari di carcinoma prostatico, ed ancora della sperimentazione *in vivo*, su modello murino, dello studio della formazione di metastasi ossee da cellule di tumore prostatico umane. Ha collaborato alla realizzazione del progetto di ricerca dal titolo "cancer homing to bone: modeling the interaction of human prostate cancer cells with human marrow stromal cells" ed infine ha collaborato alla realizzazione del progetto di ricerca sullo studio degli acidi grassi polinsaturi nel controllo dei tumori per arrivare infine allo studio del ruolo antitumorale di inibitori di Src di nuova sintesi. Come si può capire una intensa attività di ricerca che ci dà lo spessore di un personaggio che, con questo lavoro, ci offre concretamente la sintesi aggiornatissima sullo stato delle conoscenze su questo importantissimo tema.

**Sergio Rassu**

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia il Prof. Mauro Bologna per il fondamentale lavoro di revisione scientifica e la Sig.ra Maria Adele Angelucci per l'insostituibile assistenza fornita nella ricerca delle fonti bibliografiche.

# 1 Introduzione

Negli ultimi trenta anni pochi argomenti hanno influenzato la biologia cellulare allo stesso grado del chiarimento dei meccanismi molecolari alla base della morte cellulare. Più di 200 articoli riguardanti la morte cellulare programmata vengono oggi pubblicati ogni settimana. L'iniziale studio della morte cellulare, che ha visto i propri albori nell'ottocento, si è sviluppato fino al 1965 attraverso la raccolta di descrizioni strettamente morfologiche e di osservazioni occasionali in sistemi cellulari molto distanti tra loro. Tra gli anni '60 e '70 si verificano due importanti eventi in grado di dare un'accelerazione decisa agli studi sulla morte cellulare. Nel 1965 Lockshin e Williams affermano per la prima volta che la morte delle cellule durante lo sviluppo di organismi pluricellulari avviene tramite l'attuazione di un programma ideato appositamente per tale scopo: tale fenomeno fu chiamato da allora in poi "morte cellulare programmata" (PCD, Programmed Cell Death)(1). Solo nel 1972 però Kerr e Wyllie, raccogliendo l'eredità di numerose osservazioni, affermano che la morte della singola cellula è un processo inducibile in diverse situazioni fisiologiche e che è costantemente accompagnato dalla espressione sequenziale di specifici caratteri morfologici. Per tale processo venne coniato il termine di "apoptosi" (2). Solo grazie a tali definizioni si è entrati nell'era moderna delle ricerche nel campo della morte cellulare che ha portato alla progressiva scoperta dei processi biochimici e genetici che regolano la PCD. Dalla individuazione del primo componente molecolare nel sistema della morte cellulare, Bcl-2 (3), è divenuto via via più chiaro che la comprensione di un numero crescente di fenomeni cellulari fisiologici, e delle loro aberrazioni patologiche, sarebbe stato possibile solo attraverso la descrizione dei sistemi molecolari che controllano la PCD. Oggi è conoscenza scientifica consolidata che molte malattie derivano da un'errata realizzazione dell'apoptosi, nei termini sia di un'eccessiva eliminazione di cellule necessarie all'organismo, sia della impossibilità di eliminare cellule potenzialmente dannose.

Il corretto funzionamento del sistema immunitario dipende dalla capacità di riconoscere con alta efficienza elementi estranei all'organismo e di dirigere verso di essi una adeguata difesa. Per raggiungere tale scopo l'evoluzione ha messo a punto complesse strategie che sottopongono frequentemente le cellule del sistema immunitario a cicli di proliferazione-selezione. Tale turnover è fondamentale sia nell'acquisizione delle competenze immunologiche, durante lo sviluppo e nell'adulto, sia nel controllo della risposta immunitaria. La maniera attraverso cui il sistema immunitario elimina sia cellule inefficaci o non più utili, sia quelle potenzialmente autoreattive è tramite l'in-

duzione della apoptosi. Non a caso la maggior parte delle conoscenze disponibili sul processo apoptotico derivano proprio dallo studio di modelli *in vitro* che si basano sull'uso di cellule di origine immunitaria. Sebbene ancora oggi siano molti gli aspetti che rimangono da chiarire, le attuali conoscenze ci permettono di descrivere in dettaglio il ruolo dell'apoptosi in alcune delle fasi dello sviluppo e del mantenimento del sistema immunitario. Tali momenti sono rappresentati dal fenomeno della tolleranza, della risposta cellulo-mediata, dell'infiammazione e della risposta ad agenti batterici e virali. Proprio grazie allo studio dei meccanismi di protezione messi in atto da agenti virali per evitare la morte precoce nella cellula ospite, si stanno chiarendo molti degli aspetti molecolari che regolano l'apoptosi.

La complessità del quadro di controllo attuato dal sistema immunitario fa ritenere che un'errata realizzazione dei processi apoptotici possa essere altamente pericolosa per l'organismo. Lo studio delle patologie associabili a disfunzioni nel processo apoptotico è in una fase di intensa indagine e molte di tali malattie, come le sindromi autoimmuni, rappresentano tuttora una sfida centrale per la medicina. Lo sviluppo nei prossimi anni di terapie efficaci per tali patologie potrà realizzarsi solo a seguito della comprensione dei meccanismi che regolano il delicato equilibrio tra proliferazione, differenziamento ed apoptosi. Di seguito si cercherà di riassumere quelle che sono le conoscenze attuali, considerando le scoperte più recenti, sui meccanismi che regolano la apoptosi nel sistema immunitario e su alcune patologie associate.



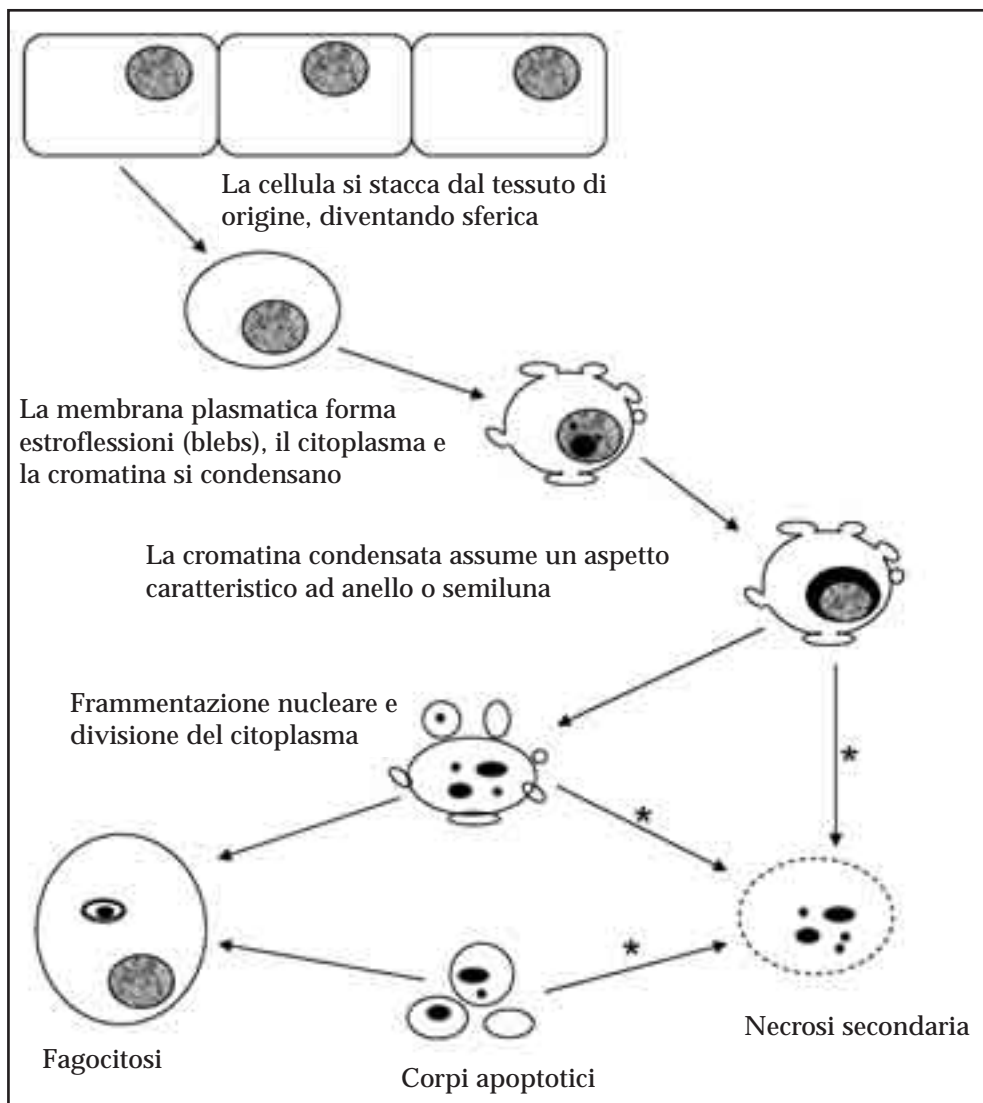
## 2 Caratteristiche generali

### 2.1 Modalità di morte cellulare

La morte di una cellula può rappresentare in un organismo pluricellulare una fonte di pericolo per l'integrità dei tessuti. Condizioni di stress fisico e chimico di particolare intensità determinano, infatti, la rottura delle membrane cellulari con conseguente rilascio del contenuto del citoplasma. La morte per necrosi è un evento pericoloso sia per il rilascio di molecole, quali enzimi proteolitici, che provocano un danno diretto alla cellula vicina, sia perchè determina una condizione pro-infiammatoria. Un altro aspetto da considerare è il rilascio di antigeni intracellulari verso i quali l'organismo non ha sviluppato tolleranza immunitaria e che sono quindi potenziale fonte di autoimmunità. In condizioni di stress più "blande" o per necessità fisiologica, gli organismi pluricellulari hanno sviluppato una modalità di morte cellulare che mira ad annullare possibili effetti traumatici. Tale modalità viene indicata come apoptosi. In particolare il termine apoptosi serve a descrivere la morte cellulare che avviene tramite la realizzazione di cambiamenti morfologici sequenziali e specifici (Fig. 1). L'apoptosi è oggi considerata solo una delle possibilità di eliminazione fisiologica delle cellule, mentre il meccanismo più generale a cui si fa riferimento per classificare la realizzazione di un programma genetico di morte è quello definito come PCD (Programmed Cell Death, morte cellulare programmata). Sono state descritte molte situazioni in cui le cellule non muoiono ricapitolando precisamente le caratteristiche morfologiche e biochimiche dell'apoptosi, ciononostante in conseguenza della numerosità dei dati sperimentali disponibili, l'apoptosi può essere considerata per le cellule del sistema immunitario la modalità di morte più frequente.

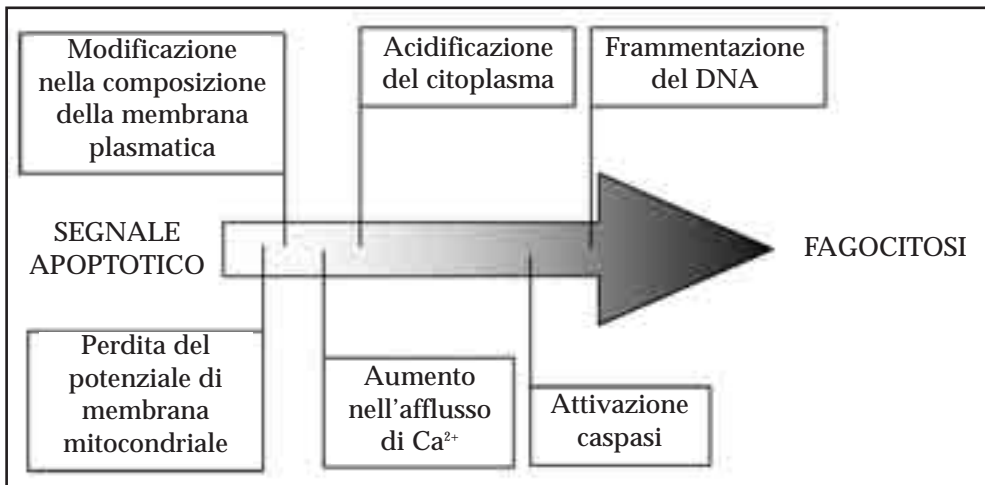
Tutte le cellule dell'organismo sono predisposte ad attuare la PCD e questa può essere invocata in tutte le fasi della vita di un organismo pluricellulare, sia durante lo sviluppo sia durante l'omeostasi dei tessuti nell'adulto:

- eliminazione di cellule ridondanti durante l'embriogenesi
- rimodellamento dei tessuti durante la crescita
- riparo e mantenimento dei tessuti
- senescenza cellulare
- modulazione del sistema immunitario
- atrofia cellulare a seguito di mancanza di fattori di crescita
- eliminazione di cellule con danni genetici irreparabili



**Figura 1. Rappresentazione schematica dei principali cambiamenti morfologici che accompagnano la morte per apoptosi.**

Si è calcolato che circa 60 miliardi di cellule (0,1 % del totale) in un uomo adulto muoiono giornalmente per apoptosi. Le cellule eliminate vengono generalmente rimpiazzate da nuove cellule creando un sistema di controllo talmente dinamico che ha spinto alcuni studiosi a preferire il termine “omeodinamica” a quello di “omeostasi” (4). L'apoptosi si realizza attraverso una specifica sequenza di eventi biochimici che ha come scopo principale di arrecare il minimo danno al tessuto a cui appartiene la cellula che muore. Tra le caratteristiche che vale la pena di ricordare in questa occasione vi è il mantenimento della integrità della membrana citoplasmatica, la frammentazione del DNA e l'espressione di molecole di segnalazione sulla superficie cellulare che ne permettono il riconoscimento da parte dei macrofagi (Fig. 2). La eliminazione delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi previene la realizzazione della cosiddetta “necrosi secondaria”, un fenomeno osservabile *in vitro* ma poco frequente *in vivo* a causa della sua pericolosità. Infatti, sebbene l'apoptosi sia caratterizzata dal mantenimento della integrità di membrana, tale caratteristica viene necessariamente a mancare in tempi più lunghi in quanto nella cellula apoptotica non esiste più un macchinario biochimico che permetta il suo mantenimento. Quindi in assenza di fagocitosi i corpi apoptotici tendono nel tempo ad aprirsi rilasciando il contenuto cellulare che, come nel caso della necrosi primaria, è dannoso per l'integrità del tessuto.



**Figura 2.** Alcuni dei principali eventi biochimici che si susseguono durante la morte apoptotica.

## 2.2 Vie di trasduzione del segnale

Al fine di comprendere le modalità di controllo del processo apoptotico, e le sue disfunzioni, è necessario conoscere le vie molecolari che ne permettono la realizzazione. Le attuali conoscenze ci indicano che l'apoptosi si realizza attraverso l'attivazione di vie molecolari multiple, ognuna delle quali prevede la partecipazione di diverse proteine regolatrici. Le molecole che prendono parte alla realizzazione delle vie di trasduzione del segnale apoptotico si possono dividere in attivatori ed inibitori della apoptosi. A seconda del tipo cellulare e della situazione fisiologica la via molecolare preferita e la sua composizione possono variare notevolmente. Dall'arrivo di un segnale pro-apoptotico possono bastare poche ore perchè l'apoptosi sia completata o anche alcuni giorni. Tale differenza può dipendere dalla disponibilità del macchinario molecolare necessario ad innescare la morte della cellula. Nel primo caso, l'attuazione rapida dell'apoptosi si realizza attraverso l'utilizzo di proteine di segnalazione già disponibili e funzionali, nel secondo caso l'apoptosi potrà compiersi solo a seguito della esecuzione di processi di regolazione trascrizionale. Oggi si conoscono due principali vie di trasduzione ed attivazione del segnale apoptotico: la via estrinseca, regolata da segnali extracellulari, e la via intrinseca, regolata da segnali intracellulari (Fig. 3). Le due vie non sono esclusive e spesso vengono attivate contemporaneamente. Inoltre sia la via estrinseca che quella intrinseca convergono verso l'attivazione dei medesimi enzimi effettori, le caspasi. Le caspasi rappresentano un'ampia famiglia di enzimi proteolitici in grado di tagliare a livello dei residui di acido aspartico (da cui il nome) un gran numero di substrati. Le caspasi vengono classificate in tre categorie ed identificate con un numero:

- caspasi iniziatrici (2, 8, 9, 10) = sono le prime ad essere attivate all'arrivo di uno stimolo pro-apoptotico. Tagliano e attivano le caspasi esecutrici. Possiedono lunghe sequenze regolatrici.
- caspasi effettrici (3, 6, 7) = tagliano e attivano substrati cellulari. Non hanno sequenze regolatrici.
- caspasi infiammatorie (1, 4, 5, 11, 13) = Non sono implicate nel processo apoptotico e hanno sequenze regolatrici nel prodominio.

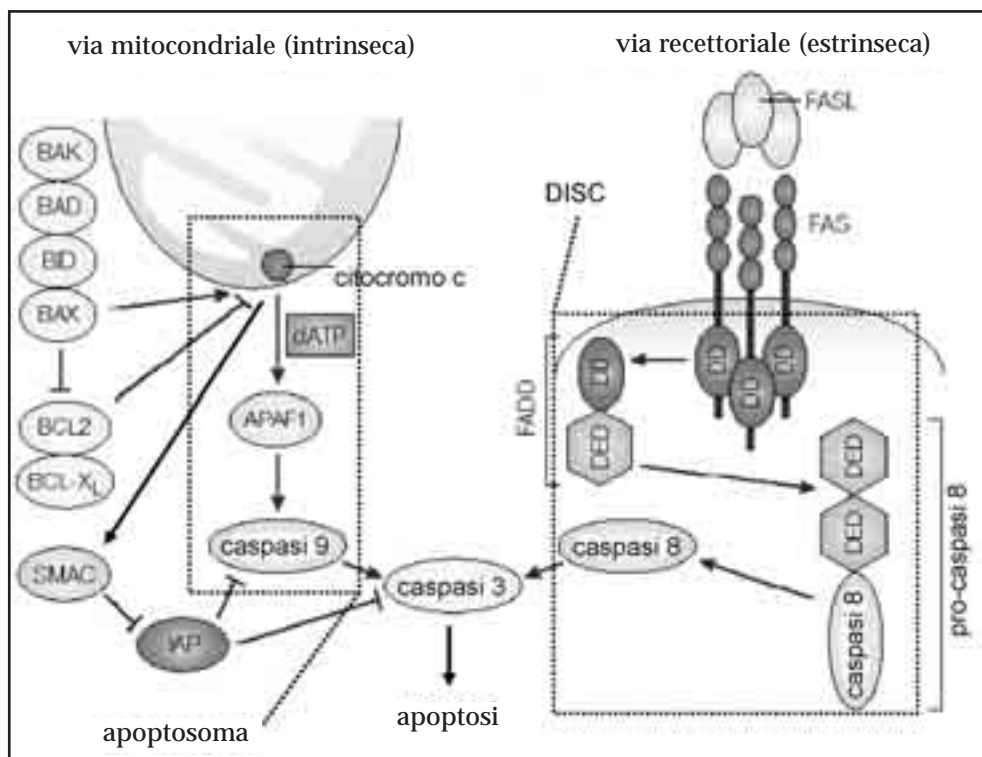
Le caspasi iniziatrici svolgono un ruolo di controllo centrale nell'avvio del segnale apoptotico e nella sua modulazione. Le caspasi effettrici, la cui attivazione è generalmente ritenuta un evento di non ritorno, ricevono il segnale apoptotico dalle caspasi iniziatrici e ne permettono l'esecuzione biochimica. Molti sono i substrati delle caspasi effettrici in grado di spiegare i cambiamenti morfologici e biochimici che si osservano durante l'apoptosi. Tra questi possiamo ricordare proteine strutturali (actina, fodrina, gelsolina),

regolatori del ciclo cellulare e del riparo del DNA (PARP, pRb, MDM2) ed un inibitore della CAD (Caspase Activated DNase).

La via estrinseca viene regolata dall'attivazione di una ben definita famiglia di recettori trans-membrana il cui prototipo è il TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor). Tali recettori si trovano normalmente in forma monomerica sulla membrana e il legame con lo specifico ligando ne determina la trimerizzazione. La formazione del trimero permette, a livello intracitoplasmatico, il richiamo di numerose molecole di caspasi 8 (anche conosciuta come FLICE) tramite la formazione di un complesso denominato DISC (Death Inducing Signaling Complex) che contiene anche proteine adattatrici. In queste condizioni, cioè in presenza di un gran numero di molecole in stretta prossimità, la seppur bassa attività proteolitica intrinseca delle pro-caspasi 8 è sufficiente a permettere l'attivazione reciproca dei zimogeni (5). La caspasi 8 una volta attivata è in grado di digerire diverse proteine tra cui la pro-caspasi 3, la cui attivazione a sua volta permette il completamento del programma di morte innescato a partire dai recettori della famiglia del TNFR. Il DISC può contenere anche la caspasi 10, però ancora oggi il meccanismo preciso della sua attivazione e la sua funzione rimangono largamente oscuri.

Fas (CD95 o TNF-RSF6) è una proteina trans-membrana, ricca in cisteina, di 335 aminoacidi che è espressa in un gran numero di tessuti embrionali e dell'adulto soprattutto nelle cellule del sistema linfoide. Fas appartiene alla famiglia del TNFR (comprendente Fas, TNFR1, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6) (6), e il legame con il suo ligando fisiologico, Fas-L (CD95L o TNF-SF6) determina la morte della cellula per apoptosi. Fas-L è una proteina di 278 aminoacidi che si trova normalmente adesa alle membrane citoplasmatiche. Osservazioni iniziali facevano ritenere che Fas-L fosse espressa solo nei linfociti T attivati, oggi si sa che Fas-L è costitutivamente espressa anche nei tessuti immunoprivilegiati, quali quelli dell'occhio. La caratterizzazione funzionale di Fas e Fas-L ha permesso di comprendere il fenotipo determinato da due particolari mutazioni genetiche: *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease). Proprio grazie allo studio dei topi con mutazioni spontanee *lpr* sono state chiarite le basi genetiche di molte linfadenopatie non maligne. I topi mostrano un accumulo anomalo nei tessuti periferici di linfociti T CD4-CD8- (linfoproliferazione) che determina linfadenopatia, megalosplenite, nefrite e una sindrome autoimmune che assomiglia nei sintomi al lupus eritematoso. La mutazione *lpr* è determinata dalla inserzione di un elemento trasponibile nell'introne 2 del gene *Fas* che ne impedisce la trascrizione dell'mRNA completo e di conseguenza l'espressione della proteina. In seguito vennero descritti altri mutanti naturali denominati *lprCG* caratterizzati da una mutazione puntiforme nella regione citoplasmatica di Fas: Ile-225 viene sostituita da Asn-225 impedendo la formazione del trimero attivo (7). I topi *gld* hanno una mutazione missenso puntiforme a

carico del gene *Fas-L* nella regione che controlla la secrezione della proteina e sviluppano grave linfadenopatia, ipergammaglobulinemia, autoimmunità e muoiono prematuramente a seguito di polmonite interstiziale.



**Figura 3.** Le due principali vie di trasduzione e di attivazione del processo apoptotico. Nella via intrinseca vengono mostrati i componenti che danno vita all'apoptosoma e alcuni dei membri della famiglia di Bcl-2 che partecipano alla regolazione del rilascio di citocromo c. L'attivazione di tale via porta al rilascio anche della proteina smac/DIABLO che blocca l'azione degli inibitori delle caspasi (IAP). Per la via estrinseca è indicato il funzionamento di Fas, con la formazione del trimero attivo e la creazione del DISC. In questo caso la proteina adattatrice che permette l'attivazione della caspasi 8 è FADD (Fas Associated Protein with Death Domain). Sono inoltre indicati i domini che permettono l'interazione tra le proteine del DISC (DD, Death Domain; DED, Death Effector Domain).

La via intrinseca dell'apoptosi prevede il mitocondrio come principale attore. Il mitocondrio infatti oltre ad essere il generatore energetico della cellula contiene al suo interno diversi fattori pro-apoptotici il cui rilascio determina velocemente il suicidio cellulare. Le molecole attualmente conosciute, e sicuramente associate all'apoptosi, contenute nel mitocondrio sono il citocromo c, Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), AIF (Apoptosis Initiating Factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with LOw pI) e diverse procaspase quali pro-caspasi 2, 3 e 9 (8). Una volta liberato nel citosol il citocromo c oligomerizza con Apaf-1 richiamando la pro-caspasi 9 e formando dei complessi multimerici denominati apoptosomi (Fig. 3). La formazione dell'apoptosoma porta all'attivazione della pro-caspasi 9, probabilmente tramite modificazione conformazionale dell'enzima (9), ed all'attivazione delle pro-caspasi attivatrici tra cui la pro-caspasi 3. Sebbene il meccanismo preciso attraverso cui il citocromo c viene rilasciato sia ancora sconosciuto, sicuramente un ruolo fondamentale è giocato dai membri della famiglia di Bcl-2 (B Cell Lymphoma-2). Tali proteine pur avendo numerose omologie di struttura possono essere divise funzionalmente in anti-apoptotiche, cioè la cui espressione impedisce il rilascio di citocromo c, quali Bcl-2 e Bcl-xL, e in pro-apoptotiche, la cui espressione ne favorisce il rilascio, quali Bax, Bak, Bad, Bid e Bim. Il dominio idrofobico presente in molte di queste proteine fa ritenere che la loro azione si esplichi a stretto contatto con la membrana esterna del mitocondrio, probabilmente regolando la formazione di pori (9).

## 2.3 Meccanismi di controllo

Ogni cellula del nostro organismo è predisposta a rispondere ad un gran numero di segnali extracellulari ed intracellulari, tra cui quelli che ne determinano la sopravvivenza. In condizioni normali è proprio il bilancio tra segnali di sopravvivenza e di suicidio a determinare il fato della cellula. L'apoptosi può essere indotta sia in conseguenza dell'attivazione di sensori interni che rilevano situazioni di stress pericolose, sia in risposta all'arrivo di specifiche molecole segnalatrici dall'ambiente extracellulare (Tab. 1). Nel primo caso, che possiamo definire come "suicidio autonomo", l'evento scatenante può essere un danno irreparabile sul DNA o sugli organelli interni, la mancanza di fattori di crescita o di sopravvivenza, quali citochine od ormoni, l'esposizione moderata ad un agente che altrimenti induce necrosi, quale calore o ipossia, o infine la presenza di agenti estranei, quali batteri o virus. Nel secondo caso, nel "suicidio indotto", la presenza di ligandi dei recettori

di morte della famiglia del TNFR, quali Fas o TNF- $\alpha$ , è in grado di scatenare l'apoptosi secondo la modalità di attivazione estrinseca.

ATTIVATORI FISIOLÓGICI	DANNI CELLULARI	AGENTI TERAPEUTICI
o Famiglia del TNF: Fas ligand TNF TGF $\beta$	o Shock termico o Infezione virale o Tossine Batteriche o Oncogeni myc, rel, E1A	o Chemioterapici cisplatino doxorubicina bleomicina metotrexato, vincristina
o Neurotrasmettitori glutammato dopamina N-metil-D-aspartato	o Oncosoppressori p53 o Linfociti T citotossici	o Radiazioni gamma
o Mancanza di fattori di crescita o Mancanza del substrato adesivo (anoikis)	o Ossidanti o Radicali liberi	
o Alti livelli di calcio o Glucocorticoidi	o Mancanza di nutrienti o Raggi UV	

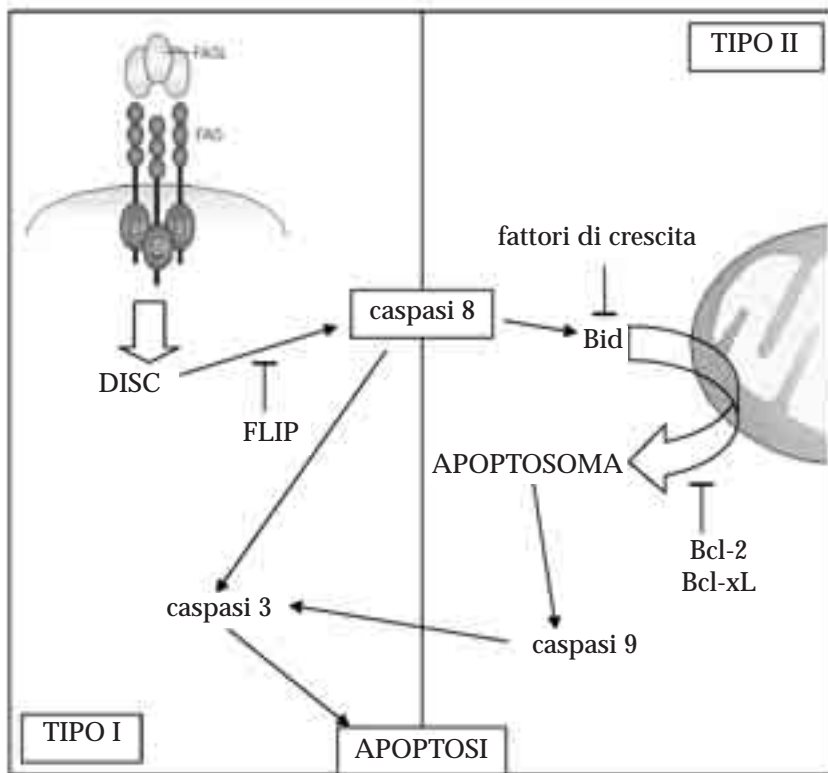
**Tabella 1. Principali eventi che scatenano una risposta apoptotica.**

Nel suicidio autonomo l'ipotesi prevalente è che la cellula riesca a monitorare lo stato funzionale di diversi parametri del proprio metabolismo attraverso lo stato di attivazione di specifiche proteine che fungono quindi da sensori. Tali proteine, in presenza di un danno irreparabile sono capaci di innescare una risposta apoptotica di natura mitocondriale. Nel caso di una rottura del DNA su entrambi i filamenti la proteina che funge da sensore è ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) una chinasi che è in grado di legare direttamente le estremità libere del DNA. ATM una volta riconosciuto il danno fosforila l'oncosoppressore p53 determinandone nell'arco di pochi minuti un aumento di stabilità e l'accumulo (10). A sua volta p53 che è un fattore di trascrizione, determina l'aumento di proteine che regolano la progressione nel ciclo cellulare e l'apoptosi, tra cui Bax. Nel caso della deprivazione di fattori di crescita la proteina sensore perde la propria attività enzimatica. Molti fattori di crescita, quali IL-3, NGF, PDGF, IGF-I sono in grado di proteggere le cellule dall'apoptosi attraverso l'attivazione di vie di trasduzione del segnale a valle dell'enzima PI3-K. Una delle proteine fondamentali in tale processo è l'enzima Akt la cui attivazione permette la fosforilazione e la conseguente inattivazione di Bad (11) così come la repressione dell'espressione di Bim (12). Forme costitutivamente attive di Akt si trovano spesso in molte cellule tumorali e determinano l'insensibilità alla apoptosi indotta da deprivazione di fattori di crescita. La sopravvivenza di linfociti sia CD4+ che CD8+ è



dipendente dalla presenza di IL-7. L'espressione del suo recettore sui linfociti è strettamente regolato sia nelle fasi dello sviluppo che durante la risposta immunitaria (13). Mediatori presenti nella via intrinseca sono i principali effettori del segnale indotto da IL-7, e comprendono PI3-k/Akt (14) e Bcl-2 (15). La morte indotta secondo tale modalità viene anche chiamata ACAD (Activated T-Cell Autonomous Death).

Negli ultimi tempi nuove evidenze stanno aiutando a chiarire che i meccanismi di controllo dell'apoptosi possono dipendere dal fenotipo cellulare. La presenza di un assetto biochimico, soprattutto per quanto riguarda le vie di trasduzione apoptotiche, stabilisce il grado di sensibilità verso uno specifico stimolo apoptotico. Il problema della sensibilità all'induzione dell'apoptosi è particolarmente importante nello studio dei tumori. Sebbene molti tumori acquisiscano geneticamente una refrattarietà alla morte per apoptosi, oggi si sa che molti trattamenti terapeutici sono in grado di ripristinare la sensibilità perduta, a testimonianza dell'esistenza di un controllo epigenetico. Un meccanismo di regolazione di questo tipo viene frequentemente usato nel sistema immunitario, ad esempio nella morte indotta da attivazione nei linfociti T (AICD). Inoltre la stessa cellula in risposta alle condizioni ambientali o in base alla propria "anzianità" può esprimere un diverso assetto nelle molecole di trasduzione che controllano la risposta apoptotica. Il caso meglio conosciuto è rappresentato dalle cellule di tipo I e di tipo II, e si realizza a valle di Fas (16) (Fig. 4). Nelle cellule di tipo I il segnale apoptotico è trasmesso secondo un meccanismo canonico che passa attraverso l'attivazione di un gran numero di caspasi 8 presenti nel DISC, a cui fa seguito l'attivazione della caspasi 3. Al contrario nelle cellule di tipo II la formazione del DISC è molto meno evidente e le scarse caspasi 8 attivate propagano il segnale tramite la via mitocondriale. In particolare la caspasi 8 taglia la proteina pro-apoptotica Bid (membro della famiglia di Bcl-2) attivandola e stimolando il rilascio del citocromo c (17). Bisogna osservare che l'attivazione mitocondriale avviene anche nelle cellule di tipo I ma essa non appare necessaria al completamento del processo apoptotico. Una delle spiegazioni alla base dell'esistenza di cellule di tipo I e II si basa sulla diversa modulabilità delle due vie di trasduzione: nelle cellule di tipo I si assiste ad un innesco dell'apoptosi rapido ed eventualmente rinforzato dalla attivazione del mitocondrio; nelle cellule di tipo II l'apoptosi può essere ulteriormente modulata dai meccanismi di regolazione presenti a ridosso del mitocondrio (membri della famiglia di Bcl-2).



**Figura 4. Fenotipo apoptotico nelle cellule di tipo I e di tipo II. La principale differenza è costituita dagli eventi a valle della caspasi 8. Nelle cellule di tipo I si assiste ad una tipica modalità di morte di natura estrinseca. Nelle cellule di tipo II la morte cellulare viene regolata principalmente a livello mitocondriale anche in conseguenza di una attivazione del recettore di morte.**

Un meccanismo più generale la cui importanza è stata scoperta solo negli ultimi anni riguarda la produzione di proteine il cui ruolo principale è di costituire dei freni alla trasduzione del segnale apoptotico. Molti di tali inibitori sono stati individuati perché espressi dai virus come omologhi funzionali col compito di impedire la morte della cellula ospite. La proteina v-FLIP (FLICE-Inhibitory Protein) prodotta dall'herpes virus inibisce il reclutamento e l'attivazione della caspasi 8 nel DISC. Nell'uomo sono stati trovati diversi omologhi di FLIP e tutti sembrano avere un ruolo anti-apoptotico. Un'intera famiglia di geni codifica inoltre nei mammiferi per proteine che sono potenti inibitori delle caspasi (IAP, Inhibitor of Apoptosis) (18). Sebbene la funzione delle IAP sia chiaramente di porre un freno alla realiz-

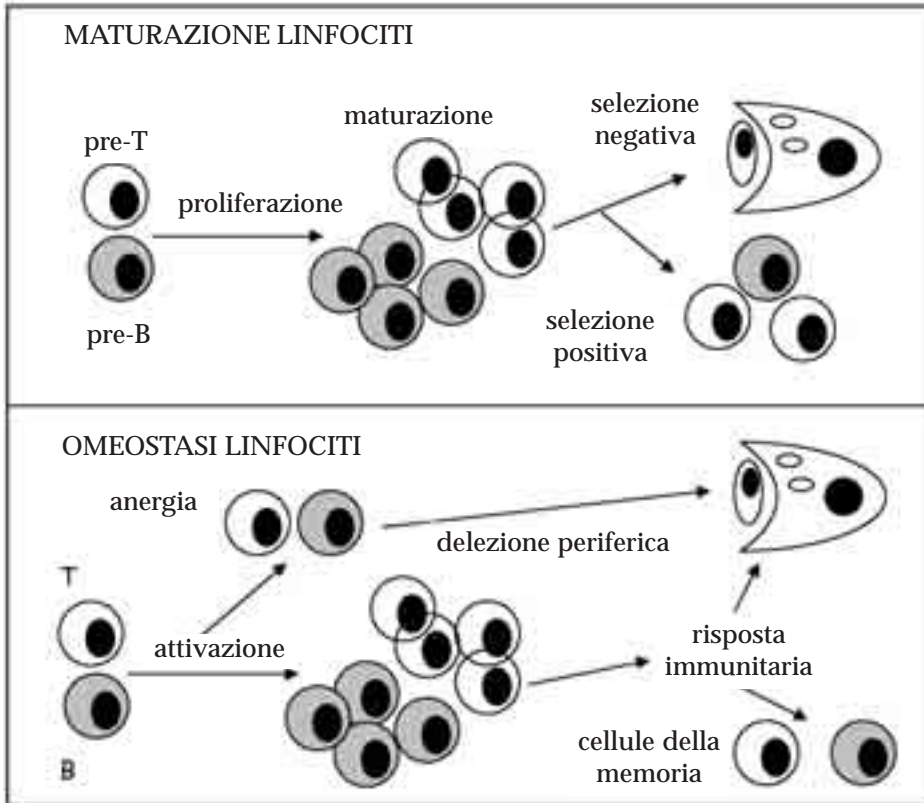
zazione dell'apoptosi sono poche le situazioni finora descritte in cui sembrano giocare un ruolo predominante. Il caso più conosciuto, e che farebbe piuttosto pensare ad un controllo soglia, è quello rappresentato dalla proteina smac/DIABLO (Fig. 3). L'attivazione della via intrinseca di morte cellulare porta al rilascio da parte del mitocondrio non solo del citocromo c ma anche di un inibitore delle IAP, smac/DIABLO, normalmente presente all'interno del mitocondrio (19). Quindi quando viene attivata la via intrinseca o in tutte quelle situazioni in cui il mitocondrio perde la propria integrità di membrana smac/DIABLO dovrebbe assicurare, sequestrando ed inibendo le IAP che il programma apoptotico non venga interrotto.

## 3 Apoptosi e sistema immunitario

### 3.1 Eventi modulati dall'apoptosi

Sono molti i momenti in cui l'organismo si serve dell'apoptosi per regolare il funzionamento del sistema immunitario. Le cellule immunitarie vanno incontro frequentemente a fasi di proliferazione a cui seguono fasi di eliminazione delle cellule in eccesso (Fig. 5). L'espansione clonale dei linfociti è necessaria per la realizzazione di una risposta immunitaria numericamente adeguata, però allo stesso tempo la persistenza di un tale armamentario, oltre ad essere dispendiosa per l'organismo, potrebbe provocare danni ai tessuti. Fenomeni di infiammazione cronica, ipersensibilità ed autoimmunità infatti possono derivare da una difettosa realizzazione dei meccanismi di “freno” della proliferazione delle cellule linfoidi. Tale fenomeno acquista un significato particolare nella definizione delle competenze immunologiche. Infatti “l'addestramento” dei linfociti rivolto al riconoscimento dei soli antigeni potenzialmente pericolosi avviene proprio attraverso l'eliminazione di quelle cellule che o non sono in grado di svolgere la propria funzione di riconoscimento o che riconoscono antigeni propri. La selezione del repertorio linfocitario sia B che T avviene sin dalle fasi dello sviluppo e procede anche nell'adulto negli organi linfoidi primari, permettendo la realizzazione della cosiddetta “tolleranza centrale”.

Allo stesso tempo, anche quando il sistema immunitario sembra inattivo, per l'assenza di infezioni, devono permanere ben attivi quei meccanismi che permettono una continua sorveglianza sulla propria integrità. In particolare l'organismo mette continuamente in atto un complesso sistema di controllo periferico sulla presenza di linfociti T “pericolosi”. Tale sistema costituisce la tolleranza periferica e permette l'eliminazione di quei linfociti sfuggiti al controllo centrale. Inoltre l'organismo risulta permissivo verso una piccola popolazione di linfociti che costituiscono le cellule della memoria. Studi recenti dimostrano che anche tale fenomeno è attivamente e continuamente controllato.



**Figura 5.** *Alternarsi di fasi di proliferazione e delezione in due momenti della vita del sistema immunitario. La maturazione dei linfociti nel midollo osseo e nel timo presuppone la selezione negativa dei linfociti autoimmuni o non funzionali (pannello superiore). Nell'omeostasi dei linfociti si assiste ad un continuo controllo selettivo che nelle fasi di "quiete" si realizza a carico delle cellule native e della memoria, mentre nella fase finale di una risposta immunitaria, prevede la delezione dei linfociti in eccesso. La mancata realizzazione della attivazione dei linfociti porta al fenomeno dell'anergia e della delezione periferica.*

## 3.2 risposta immunitaria

### 3.2.1 Omeostasi linfociti

Il mantenimento dell'omeostasi dei linfociti nell'intervallo tra due diverse risposte immunitarie è regolata tramite una complessa rete di segnali pro ed

anti-apoptotici. Sia linfociti nativi che cellule della memoria sono sotto la continua pressione di stimoli che ne determinano la sopravvivenza, la proliferazione o il suicidio. Linfociti nativi e cellule della memoria sono cellule capaci di restare vitali in circolo per molto tempo. Tali linfociti normalmente non sono proliferanti e costituiscono numericamente una popolazione che nell'adulto si mantiene costante nel tempo. Quando tali cellule vengono trasferite in un ospite che non ha linfociti T si assiste ad una loro intensa proliferazione come a voler riempire la lacuna cellulare. Inoltre, in maniera caratteristica alcune delle cellule native trasferite acquisiscono anche marcatori tipici delle cellule della memoria (20). Quindi i linfociti T sono in grado di "sentire" la presenza di segnali ambientali e di rispondere di conseguenza. Tra i recettori necessari per la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti T nativi ci sono il TCR e il recettore per IL7 (21) (22). La presenza di tali recettori viene continuamente controllata dall'organismo e in caso di assenza il linfocita muore per apoptosi. Infatti trasferendo linfociti nativi o della memoria in ospiti che non esprimono né MHC né IL7 si assiste ad una loro rapida perdita (21). I dati disponibili sembrano tutti indicare che la principale molecola anti-apoptotica a valle di TCR e IL7-R sia Bcl-2 (23).

Ancora più delicata è la regolazione della fase di remissione alla fine di una risposta immunitaria. La presentazione dell'antigene da parte di una cellula APC tramite il complesso MHC, in presenza di molecole co-stimolatorie, permette l'attivazione dei linfociti T con conseguente produzione di IL2 e del suo recettore. Il linfocita T attivo risponde alla presenza di IL2 andando incontro ad una vigorosa proliferazione e può differenziare in una cellula effettrice CD4+ o CD8+. In presenza di una infezione acuta il processo di espansione dei linfociti termina dopo qualche giorno. In presenza di un forte carico antigenico si assiste al fenomeno della delezione periferica dei linfociti T. L'iniezione sistemica in topi dell'enterotossina B di *Staphylococcus* risulta in un rapido aumento del numero di linfociti T reattivi con una espansione che si mantiene costante per 3-4 giorni, a cui segue l'eliminazione per apoptosi della maggior parte dei linfociti attivati. Topi *lpr* o *gld* non sono in grado di eliminare questi linfociti con la stessa efficienza dei topi normali (24). Quindi nella fase di massima espansione dei linfociti T o nella fase di remissione della risposta immunitaria deve entrare in gioco un meccanismo che permetta la rimozione della maggior parte delle cellule reattive. Tale fenomeno viene chiamato AICD (Activation Induced Cell Death). A seguito della attivazione i linfociti T passano attraverso diverse fasi (Fig. 6) : espansione clonale dipendente dalla presenza di IL2; eliminazione dei linfociti in eccesso; formazione delle cellule della memoria. Durante l'espansione clonale e nella fase della memoria i linfociti T sono relativamente resistenti alla morte per apoptosi (25). Ciononostante è stato dimostrato che la sopravvivenza delle cellule della memoria CD4+ richiede comunque l'espressione del



*Innesco a tempo da parte di IL2:* la morte dei linfociti può avvenire anche in presenza di IL2. L'attivazione dei linfociti, infatti, determina una progressiva sensibilizzazione verso la morte per apoptosi che molecolarmente si manifesta come espressione di Fas-L. L'esposizione di Fas-L sulle membrane plasmatiche induce apoptosi sia in maniera eterologa che autologa (27).

*Cambiamento fenotipico:* i linfociti T sensibili alla apoptosi sono cellule di tipo I e presentano un meccanismo canonico di morte a valle di Fas. I linfociti resistenti non formano DISC in presenza di Fas-L, mentre l'attivazione del mitocondrio è bloccata dalla espressione di alti livelli di Bcl-xL. In questo caso sembra che lo spostamento da un fenotipo di tipo II ad uno di tipo I possa sensibilizzare i linfociti alla morte indotta da Fas-L.

I linfociti B non sembrano essere soggetti ad AICD, almeno nella forma descritta per i linfociti T. Essi non esprimono Fas-L in nessuna circostanza e questo apre la possibilità che i linfociti B siano stimolati a morire come conseguenza dell'espressione di Fas-L sui linfociti T. Questo può avvenire sia per la delezione dei linfociti B non completamente attivati sia nella fase di remissione della risposta immunitaria.

### 3.2.2 Infiammazione acuta

Sebbene la risposta infiammatoria sia spesso necessaria per la difesa dell'ospite nei confronti delle infezioni, quando essa diventa persistente è in grado di scatenare gravi patologie, molte di carattere autoimmune. Malattie caratterizzate da infiammazione cronica, quali l'asma, possono derivare da un difetto nella eliminazione dei linfociti T tramite la morte indotta da Fas (28). Uno dei meccanismi sviluppati nella tolleranza periferica per proteggere organi in cui è importante il mantenimento della integrità è l'esistenza di privilegi immunologici (vedi tolleranza periferica). Molti altri organi che appaiono altrettanto vitali non godono di tali privilegi. Il motivo di questa differenza risiede nel fatto che rendere tali organi inaccessibili alle cellule immunitarie comprometterebbe l'immunità sistemica. Rientrano in tale categoria organi riccamente vascolarizzati quali il fegato, i polmoni, l'epidermide, e l'intestino. Per proteggere tali organi si sono sviluppati meccanismi di controllo che funzionano solo quando l'attività infiammatoria supera una certa soglia di pericolosità. Tale meccanismo risulta quindi essere un "privilegio immunitario indotto", e non si verifica nei topi che portano la mutazione *gld*. Si ritiene che il privilegio indotto avvenga con meccanismi simili a quelli attuati nella delezione periferica dei linfociti T attivati. Una risposta immunitaria di tipo infiammatorio sarebbe in grado di stimolare la produzione di Fas-L in tessuti quali il fegato, probabilmente a seguito delle citochi-

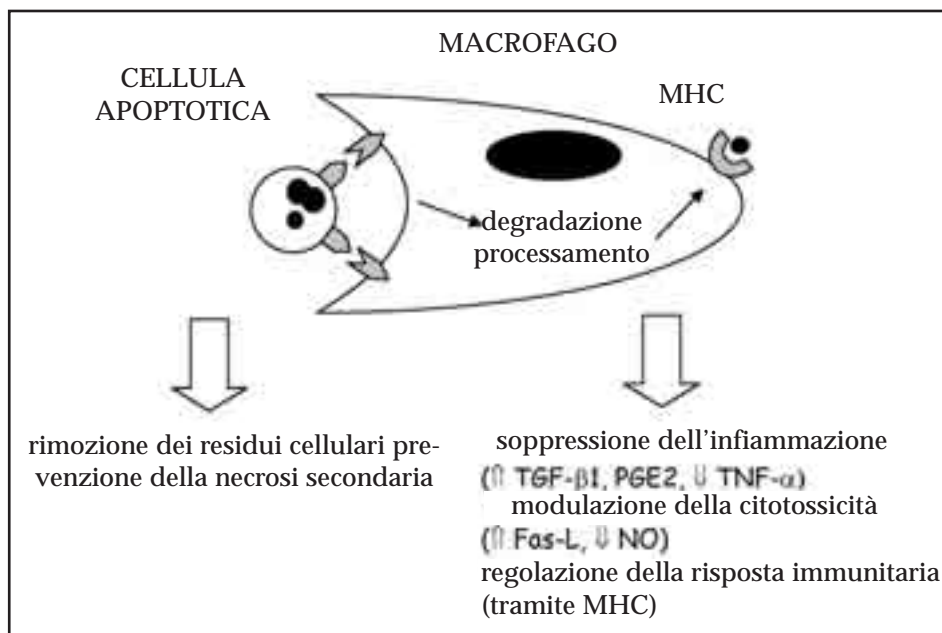


ne rilasciate dagli stessi linfociti, e tale espressione a sua volta provocherebbe l'eliminazione dei linfociti in eccesso (29). L'espressione inducibile di Fas-L avrebbe quindi il compito di limitare i danni tissutali provocati da una risposta immunitaria di grande intensità. L'inducibilità di Fas-L è stata individuata anche nella pelle a seguito della esposizione ai raggi UV. In tale caso la produzione di Fas-L potrebbe proteggere anche dallo sviluppo di malattie autoimmuni, impedendo l'attivazione dei linfociti a seguito del riconoscimento di antigeni propri rilasciati da cellule necrotiche (vedi Lupus eritematoso, e tolleranza periferica da alto dosaggio)

Un ruolo chiave nella soppressione della infiammazione è svolto dai macrofagi. Cellule immunitarie pericolose possono essere rimosse in maniera sicura dai siti di infiammazione tramite fagocitosi, terminando la fase di infiammazione acuta. Inoltre la fagocitosi delle cellule apoptotiche sopprime nei macrofagi il rilascio di mediatori pro-infiammatori quali il  $TNF-\alpha$  (30). Il processo di rimozione delle cellule apoptotiche ha quindi un duplice ruolo positivo: da una parte previene la realizzazione della necrosi secondaria con il conseguente rilascio di materiale pericoloso e dall'altra sopprime lo stato pro-infiammatorio dei macrofagi (Fig. 7). Molecole in grado di legare recettori presenti sui macrofagi, e normalmente espresse dalle cellule apoptotiche determinano una diminuzione del rilascio di  $TNF-\alpha$  ed un aumento di  $TGF-\beta 1$  dimostrando che proprio l'ingestione delle cellule apoptotiche è la causa della modulazione della soppressione autocrina e paracrina dell'infiammazione indotta dai macrofagi (31). Un'ulteriore dimostrazione del preciso controllo di tale fenomeno è offerta dal fatto che esso non si realizza in presenza di linfociti morti per necrosi (32). In alcune malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (SLE) l'organismo produce anticorpi contro la fosfatidilserina che normalmente rivestire le cellule apoptotiche. In questo caso i macrofagi non possono riconoscere le cellule apoptotiche e legando altresì le porzioni Fc degli anticorpi rilasciano  $TNF-\alpha$  promuovendo l'evento infiammatorio (33).

Sebbene Fas-L giochi un ruolo protettivo basilare nell'insorgenza dell'infiammazione, spesso modelli sperimentali ottenuti tramite espressione forzata di alti livelli di Fas-L generano estesi danni cellulari, rigetto degli allotrapianti e granulocitosi. Inoltre cellule tumorali forzate ad esprimere Fas-L inducono granulocitosi e vengono rigettate, anche quando sono trasferite in animali immunodeficienti (34). Una spiegazione a tale fenomeno è che Fas-L in tali modelli si viene a trovare in tessuti non linfoidi che normalmente non lo esprimono e in cui non vi sono meccanismi che ne possano modulare l'effetto. Una dimostrazione a conferma della validità di tale ipotesi è che quando l'espressione forzata di Fas-L avviene in cellule immunoprivilegiate, che normalmente esprimono Fas-L, non si osservano danni tissutali se non in presenza di livelli molto elevati della molecola. I meccanismi alla base della

capacità di Fas-L di indurre infiammazione sono ancora poco conosciuti. Quello che si sa è che un ruolo chiave è giocato dall'espressione di Fas sui neutrofilii (35). In determinate condizioni, probabilmente attraverso legami non canonici, Fas-L è in grado di attivare Fas presente sui neutrofilii inducendo non l'apoptosi bensì determinando l'attivazione e il rilascio di una caspasi non apoptotica, la caspasi 1 (conosciuta anche come ICE, IL1 $\beta$  Converting Enzyme) in grado di attivare la citochina pro-infiammatoria IL1 $\beta$ . Fas-L può promuovere anche la produzione di altre citochine pro-infiammatorie quali IL8. Un'altra ipotesi è che in presenza di un'attivazione costitutiva e massiccia di Fas si assista ad una morte necrotica piuttosto che apoptotica i cui effetti potrebbero stimolare la persistenza dell'infiammazione (36).



**Figura 7. Duplice ruolo della fagocitosi delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi.**

### 3.2.3 Ruolo dei macrofagi

Sin dalle prime descrizioni del fenomeno apoptotico risultò chiaro che l'ultima fase di tale processo doveva prevedere l'eliminazione "sicura" dei residui cellulari. L'eliminazione delle cellule apoptotiche nelle diverse fasi

della loro evoluzione e soprattutto a seguito della formazione dei corpi apoptotici, dipende dall'attività di cellule ad azione fagocitaria. Per molti anni il significato di tale fenomeno è stato sottostimato. Nuovi dati indicano che l'azione dei fagociti non è semplice rimozione passiva di materiale di scarto. Al contrario l'inglobazione delle cellule morte è in grado di regolare diversi fenomeni associati con l'apoptosi, soprattutto se essa avviene ad opera dei macrofagi piuttosto che di altre cellule di natura meno specializzata. Nel contesto della risposta immunitaria l'azione dei macrofagi sembra svolgere un ruolo fondamentale nella soppressione dell'infiammazione e nel controllo dell'azione contro i parassiti.

La rimozione delle cellule apoptotiche è un fenomeno strettamente regolato negli organismi pluricellulari. Nel timo di topo vengono eliminati per apoptosi diversi milioni di linfociti ogni giorno. Ciononostante se osserviamo un preparato istologico di timo possiamo individuare pochissime cellule apoptotiche. Questo significa che i timociti sono eliminati con alta efficienza e soprattutto senza generare alcun segno di infiammazione. La cellula apoptotica viene riconosciuta come tale dai macrofagi tramite l'esposizione di specifici segnali sulla membrana extracellulare. Bisogna ricordare che in tutte le fasi del processo apoptotico la membrana cellulare rimane perfettamente integra. Tali segnali funzionano come un invito ad essere "mangiati" ("eat me" signal). L'insieme dei segnali di fagocitosi è costituito da un numero relativamente alto di elementi, molti probabilmente ridondanti, che hanno la funzione di rendere il processo di eliminazione delle cellule morte altamente probabile. Sebbene la maggior parte dei segnali "eat me" siano poco conosciuti possiamo schematicamente dividerli in quattro grosse categorie (Tab. 2): modificazioni della composizione di fosfolipidi dello strato esterno della membrana plasmatica; cambiamenti nella composizione zuccherina delle glicoproteine o glicolipidi di membrana; esposizione di molecole nuove che fungono da ponte per proteine presenti nell'ambiente extracellulare; riconoscimento di specifiche proteine di membrana. La modificazione meglio conosciuta è sicuramente l'esposizione della fosfatidilserina (PtdSer) un fosfolipide che normalmente si trova confinato solo nello strato interno della membrana plasmatica (37). Cambiamenti nella composizione degli zuccheri esposti è frequente nelle cellule apoptotiche, con una diminuzione, ad esempio, del contenuto in acido sialico. Il riconoscimento degli zuccheri avviene da parte dei macrofagi tramite il legame con specifiche lectine (38). Contemporaneamente le cellule apoptotiche acquisiscono la capacità di legare molecole eventualmente presenti nell'ambiente extracellulare. Queste comprendono alcuni componenti della cascata del complemento quali C1q (39) e iC3b (40), la proteina sierica beta2-glicoproteina I (41) e la trombospondina (42). La presenza tra i fattori implicati degli elementi del complemento e della trombospondina, normalmente prodotta dai macrofagi, fa rite-

nere che molti dei meccanismi adottati si siano sviluppati proprio per facilitare l'eliminazione delle cellule apoptotiche durante una risposta immunitaria. Quello che oggi è ancora largamente oscuro è il contributo di ciascuno di questi segnali e quali siano i recettori necessari presenti sui macrofagi. Le informazioni disponibili fanno ritenere che un ruolo importante nel riconoscimento dei segnali "eat me" sia svolto da CD68 (43), CD14 (44), CD36 (31) e da alcune integrine (40). Gravi infatti possono essere le conseguenze di un mancato riconoscimento delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi. Pazienti che non esprimono C1q sviluppano nella quasi totalità dei casi di lupus eritematoso sistemico (SLE). Topi che hanno subito la delezione del gene per C1q sviluppano disordini che assomigliano a quelli visibili in SLE, e l'osservazione dei preparati istologici nei siti di infiammazione dimostra la presenza di un alto numero di cellule apoptotiche, fenomeno che sembra compatibile con un difetto nella eliminazione da parte dei macrofagi (39).

COMPOSIZIONE DELLA MEMBRANA	COMPONENTE GLUCIDICA	PROTEINE "PONTE"	SPECIFICHE PROTEINE
esposizione della fosfatidilserina sulla strato esterno	diminuzione di acido sialico  $\beta$ 2-glicoproteina I	Trombospondina iC3b C1q	ICAM-3 nucleosomi ribonucleoproteine
<b>PROBABILI RECETTORI SUI MACROFAGI</b>			
recettore per la fosfatidilserina	lectine	$\beta$ -integrine recettore $\beta$ 2-GPI recettore C1q CD36 (lega la trombospodina) CD68	CD14

**Tabella 2. Molecole espresse dalle cellule apoptotiche e corrispondenti recettori presenti sui macrofagi.**

Come abbiamo visto i macrofagi non sono semplicemente degli spazzini ma possono regolare la risposta infiammatoria. Inoltre si ritiene che i macrofagi possano indurre la morte delle cellule durante il rimodellamento dei tessuti. Questo può avvenire sia nel normale sviluppo, come nell'eliminazione dei vasi in eccesso nell'occhio (45), sia nei siti di infiammazione, determinando la morte delle cellule vicine tramite rilascio di ossido nitrico (46). Anche in questo caso l'ingestione di cellule apoptotiche determina un effetto calmante sui macrofagi che interrompe la loro attività citotossica (Fig. 7). Ciò

potrebbe spiegare il perché spesso si assiste ad una pacifica coabitazione tra cellule tumorali e macrofagi. L'effetto soppressivo indotto dall'ingestione di linfociti apoptotici viene sfruttato dal parassita *Trypanosoma cruzi* per sfuggire all'attacco dei macrofagi. *T. cruzi* durante l'infezione è in grado di indurre AICD nei linfociti T, che fagocitati dai macrofagi, ne inibiscono il rilascio di ossido nitrico (47).

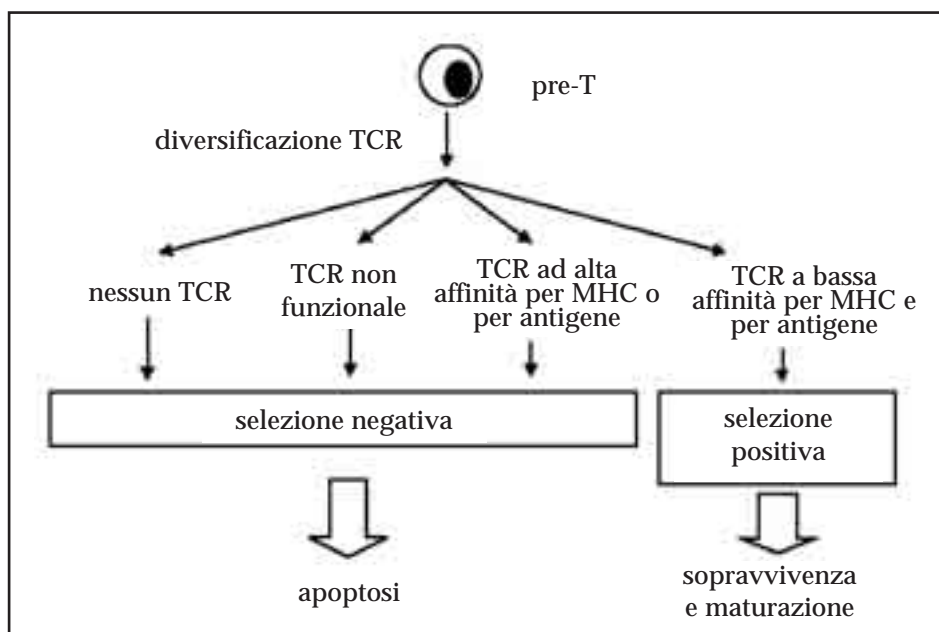
### 3.3 tolleranza immunologica

Molte delle caratteristiche di funzionamento del sistema immunitario sono da ritenere uniche. Una di queste è sicuramente la modulabilità: il repertorio di antigeni riconosciuti da linfociti T e B, inizialmente generato attraverso riarrangiamento casuale delle regioni variabili di anticorpi e TCR, è modellato da una stringente selezione in maniera da riconoscere la totalità degli antigeni presenti in natura ma non quelli propri dell'organismo. L'insieme delle strategie adottate dall'organismo per proteggere i propri tessuti dall'attacco delle cellule del sistema immunitario viene definito come tolleranza immunologica. Lo sviluppo della tolleranza si realizza attraverso due principali livelli di controllo: negli organi linfoidi centrali (tolleranza centrale) ed in seguito negli organi linfoidi periferici e nei tessuti (tolleranza periferica).

#### 3.3.1 tolleranza centrale

I precursori dei linfociti T emigrano dal midollo osseo verso il timo. Nel timo essi maturano e sono selezionati in base all'affinità di legame tra il loro TCR e l'antigene presentato tramite MHC. Tale processo prende appunto il nome di selezione per affinità (Fig. 8). Le conoscenze riguardo i meccanismi molecolari che permettono la selezione nel timo sono molto frammentari. La maggior parte dei peptidi presentati ai linfociti nel timo sono antigeni derivanti da proteine presenti nell'organismo e vengono "mostrati" tramite l'esposizione sui complessi MHC. Perché la selezione avvenga è importante sia il riconoscimento del complesso MHC che del peptide legato. I linfociti che riconoscono con alta affinità sia il complesso MHC che l'antigene presentato sono eliminati assicurando la tolleranza verso i tessuti dell'organismo. Sembra che Fas giochi un ruolo predominante proprio in presenza di un'alta concentrazione di antigene (48). La stessa sorta viene riservata ai linfociti che non esprimono TCR o che ne esprimono una forma non funzionale cioè non

in grado di legare MHC. In topi transgenici incapaci di formare DISC si assiste alla proliferazione anche dei linfociti che non esprimono TCR. Normalmente solo i linfociti che producono un TCR funzionale lasciano il timo e popolano gli organi linfoidi secondari. Questi linfociti sono quelli che hanno un debole o assente riconoscimento del peptide legato al complesso MHC. I linfociti T che interagiscono con i complessi MHC di classe II diventano CD4+ mentre se interagiscono con MHC I diventano CD8+. Un topo adulto è in grado di generare nel timo circa 30 milioni di nuovi linfociti T in un giorno, però quelli che lasciano il timo sono solo il 2% del numero totale.



**Figura 8. Modello di maturazione dei linfociti T nel timo definito come “selezione per affinità”.**

I linfociti B esprimono ciascuno un anticorpo a singola specificità antigenica. La somma di tutte le specificità anticorpali viene definita “repertorio” di anticorpi. Come per i linfociti T si pensa che la selezione avvenga tramite un meccanismo di selezione per affinità in cui il ruolo principale è svolto da BCR (B-cell receptor). Linfociti B che producono BCR con alta affinità per proteine derivate dai tessuti propri sono eliminati.

### 3.3.2 tolleranza periferica

La tolleranza centrale non è sufficiente ad eliminare tutti i linfociti potenzialmente autoreattivi. Infatti nel timo è presente solo una parte dei possibili antigeni propri. Per questo motivo il mantenimento della tolleranza viene eseguito tramite una serie di complessi e in parte ancora sconosciuti sistemi di regolazione a livello degli organi linfoidi periferici e dei tessuti. L'insieme di tali meccanismi, che verranno illustrati di seguito, prende il nome di tolleranza periferica.

#### MATURAZIONE SECONDARIA DEI LINFOCITI B

I linfociti B maturi lasciano il midollo osseo e vanno a popolare gli organi linfoidi secondari, quali la milza i linfonodi e il tessuto linfoide associato all'intestino. Una volta attivati dalla presenza di un antigene i linfociti B vanno incontro ad un nuovo turno di diversificazione del proprio repertorio anticorpale e di selezione per affinità, a seguito del quale si trasformano in plasmacellule. Tale selezione avviene in concomitanza con il processo di ipermutabilità somatica durante il quale si generano cloni linfocitari ad alta variabilità anticorpale. I linfociti B prodotti in questa fase vengono selezionati sulla base della funzionalità e dell'affinità verso antigeni propri: linfociti B non funzionali o autoimmuni vengono eliminati per apoptosi, mentre gli altri producono plasmacellule e cellule della memoria. Le stesse plasmacellule, che sono cellule a vita molto lunga, ed in particolare quelle che ritornano a colonizzare il midollo osseo, sembrano costituire una buona percentuale delle cellule della memoria (49).

#### DELEZIONE DEI LINFOCITI PERIFERICI

La eliminazione per apoptosi può interessare anche i linfociti T maturi presenti negli organi linfoidi secondari. Essa avviene in quei linfociti che pur riconoscendo un antigene, essendo questo proprio, non ricevono i necessari segnali co-stimolatori. Il meccanismo molecolare alla base di tale fenomeno presenta elementi in comune a quello osservato nell'AICD (vedi omeostasi) ed è fondamentale come seconda linea di difesa nella eliminazione delle cellule auto-reattive che si trovano in periferia. Anche durante l'AICD il linfocita T attivato può entrare nella fase di refrattarietà all'apoptosi solo in presenza di opportuni segnali co-stimolatori. Il CD28 è il principale recettore co-stimolatorio espresso dai linfociti T ed è attivato dalle molecole CD80 e CD86 presenti sulle cellule APC. La stimolazione del CD28 determina da parte del linfocita la produzione di citochine e di recettori delle citochine. In topi transgenici deficitari per CD28 si assiste ad una drastica riduzione nello sviluppo e nelle funzioni dei linfociti T, con una inibizione della formazione dei centri germinativi e una scarsa produzione di immunoglobuline IgG (50). La

presenza di un segnale co-stimolatorio è in grado di bloccare la apoptosi nei linfociti a tre diversi livelli: inibizione della attivazione di caspasi 8 tramite FLIP (51), espressione di Bcl-xL (52), inibizione temporanea della espressione di Fas-L (51). In tale modo si blocca l'apoptosi sia nelle cellule di tipo I che in quelle di tipo II, mentre contemporaneamente si impedisce l'espressione del principale induttore di apoptosi autologa, Fas-L. Nelle stesse condizioni in cui avviene la delezione si può verificare l'anergia (vedi). I dati in nostro possesso non ci permettono di discriminare quali sono le condizioni ambientali che favoriscono un meccanismo rispetto all'altro.

La co-stimolazione sembra essere fondamentale per la sopravvivenza anche delle cellule della memoria. La molecola OX40 espressa dai linfociti T permette il mantenimento di alti livelli di Bcl-2, Bcl-xL e di Akt attiva (53) e sembra essere implicata preferenzialmente nella sopravvivenza delle cellule alla fine dell'infezione. Il ligando di OX40 è stato individuato nei linfociti B attivati, nei macrofagi e nelle cellule dendritiche. CD27 è un altro co-stimolatore critico per lo sviluppo della memoria T, e viene espresso preferenzialmente dai linfociti CD4+ e CD8+ a seguito della attivazione (54).

Per quanto riguarda i linfociti B la molecola di membrana che svolge un importante ruolo nella fase di co-attivazione è CD40. In linfociti B attivati tramite stimolazione del BCR possono completare la loro maturazione solo in presenza di CD40L (ligando di CD40) normalmente espresso sui linfociti T e sui macrofagi.

#### ANERZIA CLONALE

I linfociti che incontrano antigeni solubili in grado di legare i recettori BCR o TCR in assenza di fattori co-stimolatori entrano in una fase di quiescenza da cui non sembrano poter più uscire. L'anergia serve a integrare la selezione clonale effettuata durante lo sviluppo della tolleranza centrale inibendo i linfociti autoreattivi che potrebbero potenzialmente attivarsi nei tessuti periferici o in presenza di alte concentrazioni di antigene. Non è ancora noto quale sia il reale destino dei linfociti anergici e se l'anergia costituisca solo una fase temporanea prima della delezione periferica (vedi). L'anergia clonale risulta particolarmente efficace nel controllo dell'autoreattività dei linfociti B, infatti la loro attivazione è possibile solo in presenza di linfociti Th che a loro volta devono presentare la medesima autoreattività. Allo stesso tempo se il linfocita Th esprime Fas-L, ad esempio durante una risposta immunitaria, anche in presenza di collaborazione cellulare, il linfocita B viene indotto a morire per apoptosi.

#### PRIVILEGI IMMUNOLOGICI

La dimostrazione iniziale che Fas-L fosse implicata nel mantenimento dei privilegi immunologici si è avuta grazie agli studi condotti sull'occhio. Fas-L



è altamente espresso nell'occhio e la perdita della sua funzionalità intensifica i danni provocati da una eventuale risposta immunitaria localizzata (55). Inoltre l'iniezione diretta nell'occhio, di linfociti T prelevati da topi normali, ma non da topi *lpr*, provoca la morte di questi ultimi per apoptosi (56). Oggi si è appurato che Fas-L sia nella sua forma inducibile che costitutivamente espresso può proteggere dalle malattie infiammatorie molti tessuti, quali il cervello e la tiroide. Immunizzando topi con la proteina basica della mielina si ottiene un modello sperimentale di encefalomielite, che assomiglia per molti aspetti alla sclerosi multipla, che induce una paralisi transiente dell'animale. Se si prelevano i linfociti T autoreattivi generati in tale modello e si iniettano in topi *gld* (che non esprimono Fas-L) si induce una patologia cronica e progressiva che non è osservabile se i linfociti vengono iniettati in animali normali (57). La causa di tale fenomeno viene fatta risalire al ruolo svolto da Fas-L nelle cellule neuronali durante la remissione della malattia. Un meccanismo simile è conosciuto anche per la tiroide. Quando si immunizzano topi contro l'ormone tireoglobulina si induce sperimentalmente la tiroidite. Osservando dopo colorazione istologica sezioni della tiroide di tali topi si osserva un'alta percentuale di linfociti T infiltranti apoptotici che però non è in grado di proteggere dallo sviluppo di fenomeni di autoimmunità. In presenza di alti livelli d'espressione di Fas-L nelle cellule della tiroide, ad esempio in topi transgenici, la tiroidite autoimmune non si sviluppa (58). Un aspetto interessante che si verifica contemporaneamente alla protezione della tiroide dalla distruzione autoimmune è lo sviluppo di un fenomeno di immuno deviazione sistemica, con lo spostamento della risposta immunitaria da un meccanismo cellulare mediato ad uno anticorpo mediato (vedi immuno-deviazione)

Studi condotti tramite somministrazione di antigeni nei tessuti immunoprivilegiati, ad esempio nell'occhio, mostrano che non si ha lo sviluppo di linfociti T reattivi per tali antigeni. Inoltre la presentazione nei tessuti immunoprivilegiati induce la tolleranza verso antigeni di diversa origine che normalmente sono immunogeni. Una delle spiegazioni più semplici a tale fenomeno è la contemporanea presenza dell'antigene e di alti livelli di Fas-L che determinano una selezione negativa dei linfociti in grado di riconoscere l'antigene somministrato. Non sono da escludere però meccanismi più complessi.

Oggi si ritiene che la sola espressione di Fas-L in assenza di altri immunomodulatori non sia sufficiente a proteggere un tessuto con privilegio immunologico. La co-espressione di Fas-L e della citochina immunosoppressiva Tgf- $\beta$  costituisce una protezione maggiore al rischio di infiammazione in diversi modelli sperimentali, impedendo contemporaneamente l'attivazione dei neutrofili (59). Allo stesso tempo si è visto che quando Fas-L risulta inefficace possono subentrare altri meccanismi quali l'induzione dell'apoptosi tramite TNF (60).

### ALTO DOSAGGIO DI ANTIGENE

La somministrazione sistemica di un antigene ad alto dosaggio può indurre la tolleranza immunitaria probabilmente attraverso diversi meccanismi. In uno di questi è coinvolto il sistema Fas/Fas-L. Modelli sperimentali di Miastenia gravis possono essere ottenuti tramite immunizzazione con il recettore dell'acetilcolina. La somministrazione della proteina solubile provoca la tolleranza verso questo antigene, come è dimostrato dalla insensibilità degli animali al ricomparsa della malattia a seguito di successive immunizzazioni. La tolleranza però non si realizza in quegli animali che portano difetti genetici su Fas o Fas-L (61). Similmente l'esposizione ai raggi ultravioletti promuove la tolleranza verso antigeni successivamente somministrati sottocute. Dal momento che i raggi UV inducono la produzione di Fas-L nell'epidermide, la sua espressione potrebbe essere necessaria per l'acquisizione di tale tolleranza. Anche in questi casi è probabile che la tolleranza si verifichi in seguito alla eliminazione dei linfociti T reattivi tramite induzione dell'apoptosi, non permettendo una risposta successiva al momento della seconda somministrazione dell'antigene.

### IMMUNO-DEVIAZIONE

Una meccanismo più complesso ed ancora non completamente conosciuto è rappresentato dalla modulazione delle cellule che determinano il tipo di risposta immunitaria. Tale ipotesi deriva anche dall'osservazione che in molti casi una specifica tolleranza può essere trasmessa ad animali che non hanno mai ricevuto l'antigene immunizzante, semplicemente trasfondendo cellule del sistema immunitario. La fagocitosi delle cellule mandate in apoptosi tramite il sistema Fas-Fas-L da parte di cellule che presentano l'antigene, quali le cellule dendritiche, è in grado di modulare l'attivazione dei linfociti Th. Infatti cellule dendritiche in presenza di linfociti apoptotici, oltre alla fagocitosi provvedono a dirigere il differenziamento dei linfociti T CD4+ circostanti, inibendo la maturazione di linfociti Th2 in favore di quella dei linfociti Th1. Tale fenomeno viene chiamato immuno-deviazione, e si pensa possa essere determinato o direttamente dai linfociti che muoiono per apoptosi o dalle cellule dendritiche che li fagocitano. Nel primo caso un ruolo chiave potrebbe essere svolto dai fattori rilasciati dai linfociti apoptotici prima di morire e che comprendono citochine quali la IL10 che possono modulare la risposta alla presentazione dell'antigene. Un'altra citochina prodotta dai linfociti apoptotici è il TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) che è un ben noto fattore immunosoppressivo.

### IGNORAMENTO IMMUNOLOGICO

Molti antigeni propri sono presentati con una frequenza così bassa da non poter indurre né la selezione negativa né l'attivazione dei linfociti. Tale feno-

meno si realizza in quanto le cellule APC per poter selezionare o attivare un linfocita devono presentare contemporaneamente un numero minimo di peptidi identici. Quando questo non è possibile poiché la proteina di partenza è presente in quantità molto limitata, il linfocita semplicemente ignora l'epitopo presentato. Questo è sicuramente un meccanismo importante per evitare di attivare con troppa facilità la difesa immunitaria.

#### MODALITÀ DI PRESENTAZIONE DELL'ANTIGENE

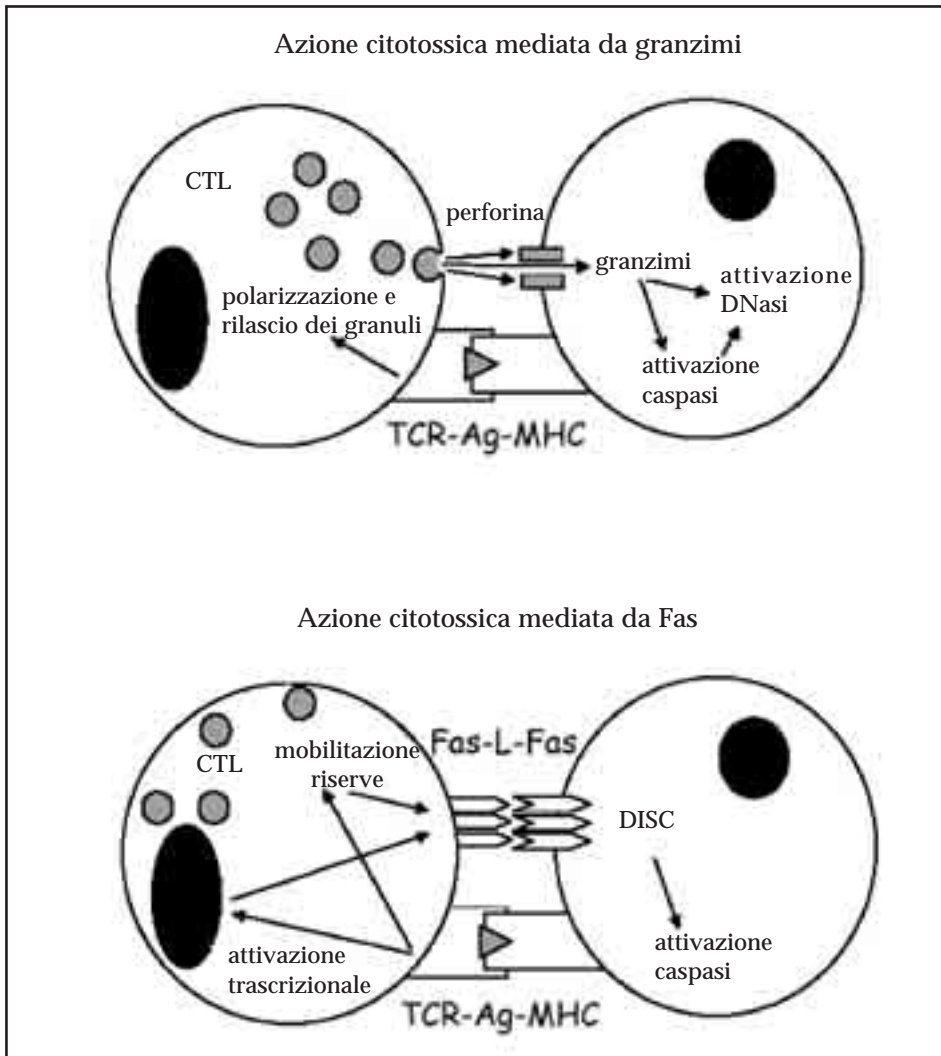
Le cellule apoptotiche possono essere fagocitate in condizioni fisiologiche anche dalle cellule dendritiche. Queste ultime svolgono però un altro importante ruolo che è quello di APC e possono quindi presentare antigeni derivanti dalle cellule apoptotiche ai linfociti Th (62). La presentazione di tali antigeni, dal momento che potrebbe indurre una risposta autoimmune, deve essere soggetta ad un controllo molto stringente. L'ipotesi attualmente accettata prevede che in assenza di stimoli pro-infiammatori le cellule dendritiche attraverso la presentazione degli antigeni "apoptotici" siano in grado di rinforzare la tolleranza (63). Non si sa se tale mantenimento della tolleranza avvenga tramite un meccanismo anergico o tramite la delezione per apoptosi dei linfociti T autoreattivi.

### 3.4 Azione citotossica

Le cellule infettate da virus o tumorali sono eliminate dal sistema immunitario tramite il rilascio di proteine solubili in grado di indurre una rapida apoptosi nella cellula bersaglio. Il segnale di morte è veicolato sia dai linfociti T citotossici (CTL, Cytotoxic T Lymphocyte) sia dalle cellule NK (Natural Killer) ambedue in grado di rilasciare lisosomi specifici che contengono le proteine necessarie per iniziare l'apoptosi. Le molecole chiave che vengono rilasciate sono le proteasi della famiglia dei granzimi e la proteina perforina. Gli enzimi dei granuli, o granzimi, rappresentano il 90% della massa dei granuli citolitici, lisosomi secretori specializzati, di CTL e cellule NK. I granzimi sono una famiglia di enzimi strutturalmente correlati e simili alla chimotripsina e presenti nei lisosomi come enzimi già attivi. Nell'uomo se ne conoscono 5: granzimi A, B, H, M, e triptasi-2 (granzima 3). L'espressione dei granzimi è ristretta ai linfociti T attivati, ai timociti e alle cellule NK. Il granzima M sembra essere espresso solo nelle cellule NK. I granuli citolitici che sono uniformemente distribuiti nel citosol, al momento del riconoscimento della cellula bersaglio vengono rapidamente spostati in prossimità della porzione di membrana in cui deve avvenire il rilascio (fenomeno di polarizza-

zione) (Fig. 9). Quando i granuli vengono rilasciati, la perforina si lega secondo un meccanismo  $Ca^{2+}$  dipendente alla membrana della cellula bersaglio formando dei pori attraverso cui possono entrare i granzimi. Topi transgenici mancanti di perforina sono completamente deficitari di apoptosi indotta da granzimi e sono soggetti a gravi infezioni dovute ad un gran numero di agenti virali (64). Il granzima B dimostra il più alto potenziale apoptotico rispetto agli altri membri della famiglia, però topi mancanti di tale enzima hanno un'immunodeficienza che è molto meno evidente di quelli che mancano della perforina. Il granzima A, a cui appartiene una più debole attività apoptotica, testimoniata *in vitro* dalla frammentazione del DNA, è stato recentemente implicato nell'induzione di apoptosi in maniera caspasi-indipendente. Il granzima A sembra funzionare agendo sul reticolo endoplasmatico favorendo il rilascio della DNasi GAAD (GrA-activated DNase) (65). Il granzima B taglia ed attiva diverse pro-caspasi mentre può attivare direttamente la DNasi CAD liberandola dal complesso con il suo inibitore, ICAD. Molto significativo è il fatto che sia il granzima A che B siano attivatori diretti di DNasi suggerendo l'importanza della digestione rapida del DNA in cellule infettate da virus. L'espressione forzata di Bcl-2 è in grado di inibire l'apoptosi indotta da granzima B indicando che la distruzione mitocondriale è indispensabile per la realizzazione del processo apoptotico (66). L'azione protettiva di Bcl-2 può essere compresa considerando che uno dei bersagli del granzima B è Bid, la cui digestione porta al rilascio del citocromo c (67).

Esiste anche un meccanismo complementare a quello perforina/granzima. Le cellule CTL e NK possono eliminare le cellule bersaglio tramite un meccanismo che è indipendente dall'espressione di perforina. Topi che non producendo perforina esprimono un'attività litica da parte dei CTL paragonabile ai topi normali (68). Tale meccanismo complementare è stato associato all'espressione del Fas-L sulla superficie dei linfociti citotossici (69). Il Fas-L viene espresso in maniera transiente dai CTL a seguito della attivazione del TCR (70) o del CD3 (71). Una delle ipotesi più probabili è che l'attivazione dei CTL invii un segnale trascrizionale all'interno del linfocita che faccia aumentare i livelli di mRNA di Fas-L (72). L'espressione transiente della proteina permette di attivare il Fas presente sulla cellula bersaglio che ha presentato l'antigene estraneo. Evidenze più recenti fanno ritenere che l'aumento di espressione di Fas-L non sia legato necessariamente ad una regolazione trascrizionale e che sia invece dovuta ad una veicolazione di proteine già presenti all'interno del citoplasma (73). Secondo quest'ultima ipotesi la risposta sarebbe molto più rapida e probabilmente permetterebbe un controllo temporale dell'evento apoptotico molto più preciso. Tale regolazione sarebbe in accordo con i dati che dimostrano una polarizzazione del citoscheletro del CTL a seguito del legame TCR/MHC (74) permettendo di concentrare le proteine di membrana tra cui Fas-L nella porzione di contatto tra cellula bersaglio e CTL.



**Figura 9.** Le due modalità di morte indotta da linfocita citotossico (CTL) nella cellula bersaglio a seguito del riconoscimento antigenico.

### 3.4.1 Regolazione dei linfociti CTL

L'uso di modelli sperimentali ha permesso di dimostrare che una esposizione di 24 ore all'antigene è sufficiente per stimolare una risposta mediata da CTL. A seguito di tale attivazione i linfociti vanno incontro ad una serie di 7-10 cicli di divisione cellulare e generano CTL funzionali anche in assenza

dell'antigene scatenante (75). Sebbene una breve esposizione antigenica sia sufficiente a stimolare una risposta dei CTL, l'intensità di tale risposta è direttamente proporzionale alla dose di antigene (76). La piena funzionalità dei CTL si realizza attraverso l'espressione di molecole effettrici quali l'interferone gamma (IFN- $\gamma$ ), la perforina e il granzima B. Al termine dell'infezione la popolazione totale di CD8+ diminuisce di oltre il 90%. Anche i CTL, come gli altri linfociti T, in presenza di prolungata esposizione a IL2 diventano maggiormente sensibili alla morte indotta da Fas. L'apoptosi si verifica in particolare in presenza di una nuova stimolazione tramite TCR, nel processo noto come AICD (77). Tale sensibilizzazione può avvenire tramite la modulazione negativa di FLIP (78). Anche la via intrinseca sembra giocare un ruolo importante. La progressiva diminuzione delle citochine di sopravvivenza determina un abbassamento nell'espressione di membri anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2 (79).

La sopravvivenza dei linfociti CD8+ è possibile grazie all'azione dei linfociti CD4+. In assenza di questi ultimi si è visto che vi è un difetto nel mantenimento di linfociti CD8+ della memoria (80) che sembra essere dovuto all'incapacità di esprimere il recettore per la citochina di sopravvivenza IL7 (81). L'aiuto dei linfociti CD4+ sembra essere inoltre fondamentale per il mantenimento nei CTL di alti livelli di Bcl-2, Bcl-xL e FLIP, tutte molecole anti-apoptotiche (82). Quando si assiste ad una attivazione dei CTL in assenza di linfociti Th si verifica inoltre una over-espressione di modulatori dell'apoptosi quali Fas e TRAIL, che inducono la morte dei linfociti al momento della espansione secondaria (82). Tale fenomeno potrebbe avere una grande importanza anche nel mantenimento della tolleranza periferica.

### **3.4.2 infezioni virali**

L'infezione da parte di un virus può indurre direttamente la morte della cellula ospite. Questo può avvenire in conseguenza dell'attivazione di sensori di stress, quali p53, che rilevano alterazioni nel macchinario di sintesi proteica o di duplicazione del DNA. In caso di persistenza dell'infezione vengono attivate numerose risposte cellulari ed umorali atte a impedire la disseminazione del virus. La principale difesa viene attuata attraverso l'attivazione dei linfociti ad attività citotossica, CTL e NK. Il riconoscimento della cellula infettata da parte dei linfociti citotossici avviene secondo due principali modalità: il riconoscimento mediato da anticorpi (ADCC, Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity), o tramite il complesso MHC. Nell'ADCC i CTL e le cellule NK riconoscono tramite i loro recettori Fc (CD16) gli anticorpi legati alle cellule infettate e inducono apoptosi nella cellula bersaglio. Gli anticorpi riconoscono antigeni virali esposti sulla membrana della cellula ospite e, nel caso essi facciano parte del repertorio natu-

rale o acquisito in precedenti infezioni, rappresentano una difesa immediata. Nella risposta innata i linfociti NK possono riconoscere cellule infettate tramite l'assenza del complesso MHC I. La presenza del virus può in molti casi rallentare o bloccare la sintesi proteica della cellula ospite e questo porta all'impossibilità nell'espore il complesso MHC I. Il linfocita NK è in grado di riconoscere MHC I singenico tramite il recettore Ly49 la cui attivazione determina una inibizione della attività citotossica della cellula NK. In assenza del legame con MHC I, interviene un altro recettore, NKR-P1, che riconosce residui glucidici espressi su molte cellule e che attiva l'attività citolitica delle NK. Il citomegalovirus ha sviluppato un meccanismo per ingannare le cellule NK anche in assenza della espressione di MHC sulla cellula ospite. Il virus infatti produce una proteina, UL18, analoga al complesso MHC, in grado di legare il recettore CD94 sulle cellule NK inibendone l'attività citotossica (83).

L'attività delle cellule NK e CTL, può essere enormemente stimolata in presenza di citochine della famiglia degli interferoni (IFN). Oggi si ritiene che durante un'infezione virale gli interferoni giochino un ruolo indispensabile sia nell'immunità innata che nell'attivazione e nel reclutamento delle cellule della risposta adattativa. Topi transgenici mancanti del sistema IFN funzionale sono estremamente sensibili all'infezione letale di diversi virus (84) (85). Sebbene l'interferone sia stato scoperto negli anni '50 ancora oggi l'esatto meccanismo attraverso cui svolge la propria azione antivirale rimane sconosciuto. Appartengono a questa famiglia le proteine divise in due categorie: IFN di tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), prodotti da un gran numero di cellule; IFN di tipo II ( $\gamma$ ) prodotto esclusivamente da linfociti Th1 e NK. Gli interferoni sono sotto il controllo trascrizionale di fattori che segnalano la presenza nella cellula di virus e di RNA a doppio filamento. Una volta secreti gli IFN legano specifici recettori e inducono la trascrizione di decine di prodotti genici sotto il controllo della via di STAT (86). IFN è in grado di inibire la replicazione di numerosi virus senza danneggiare l'ospite. Inoltre vi sono evidenze di un legame tra l'azione di IFN e l'apoptosi. IFN sembra sensibilizzare le cellule alla morte per apoptosi e tale processo si realizza attraverso l'attivazione della caspasi 8 dopo formazione del DISC (87). Appare quindi plausibile che la presenza di IFN stimoli l'espressione e l'attivazione di recettori di morte. Un meccanismo compatibile con tale ipotesi è stato osservato *in vitro*. Infatti tramite il trattamento con IFN- $\gamma$  di cellule di glioma, adenocarcinoma e linfociti T, si ha un'induzione nell'espressione di Fas (88) (89). Quello che rimane largamente sconosciuto è il meccanismo che a seconda del tipo di virus, o dell'entità del danno, determina che IFN induca o la morte per apoptosi o l'inibizione della replicazione virale (90). Un'altra possibile azione apoptotica di IFN si realizza in maniera indiretta. IFN di tipo I è in grado di stimolare la produzione di TRAIL nei linfociti periferici sia CD8+ che CD4+, mentre IFN di tipo II stimola TRAIL nei fibroblasti. L'esposizione di TRAIL permette l'uccisione delle cellule infettate dal virus (91).

Se da una parte l'ospite si serve dell'apoptosi per eliminare le cellule infettate, i virus hanno "imparato" a proteggersi da tale attacco. Le protezioni attuate dai virus possono essere divise in due grosse categorie: inibizione della morte apoptotica della cellula ospite; induzione di immunodeficienza tramite uccisione delle cellule del sistema immunitario. Per evitare la morte della cellula ospite i virus hanno realizzato un gran numero di strategie basate tutte sull'interferenza nel macchinario molecolare che permette la realizzazione dell'apoptosi (Tab. 3). La strategia scelta può essere molto diversa da virus a virus, ma la alta frequenza con cui alcune vie apoptotiche sono prese di mira testimonia l'esistenza di bersagli molecolari chiave: Bcl-2, caspasi, e TNFR. L'infezione può essere ad esempio dipendente dall'espressione di omologhi virali che hanno la stessa funzione di Bcl-2. E1B-19K prodotta dall'adenovirus mima l'azione di Bcl-2 bloccando l'interazione tra Bax e Bak indotta da p53, e di conseguenza inibisce il rilascio di citocromo c (92). L'azione di E1B-19K è in grado di bloccare anche l'apoptosi indotta da TNF e tale meccanismo potrebbe avere una importanza fondamentale nell'infezione di cellule di tipo II (vedi) (93). Sono stati individuati anche altri omologhi funzionali di Bcl-2 quali BHRF1 e BALF-1 (Epstein Barr virus), KSBcl-2 (herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi, KSHV), MHV-68 (herpesvirus di topo). Altri virus possono regolare l'espressione dei membri della famiglia di Bcl-2 a livello trascrizionale. La proteina Tax del virus della leucemia umana di tipo I (HTLV-1) attiva la trascrizione di Bcl-xL e reprime quella di Bax (94).

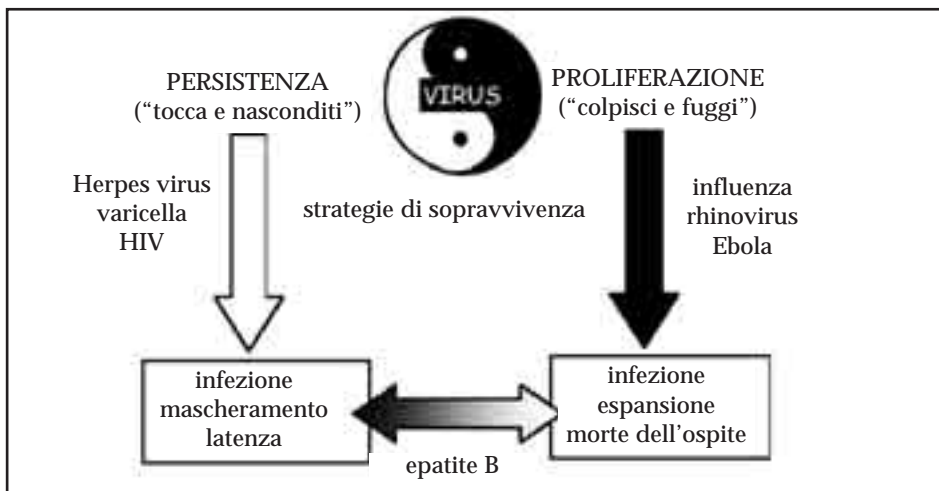
Le caspasi giocano un ruolo centrale nell'apoptosi e sono controllate dai virus in diversi modi. L'attività delle caspasi è regolata da una famiglia di inibitori che furono inizialmente individuati in baculovirus, v-IAP (95). Oggi si conoscono 9 membri della famiglia di IAP che sono in grado di inibire sia le caspasi attivatrici che iniziatrici (96). I poxvirus producono CrmA che inibisce sia la caspase 8, e quindi l'apoptosi da Fas, sia la caspasi 1 bloccando la formazione della citochina infiammatoria IL1- $\beta$  (97).

Numerosi virus colpiscono l'attivazione della famiglia di TNFR, testimoniando l'importanza di tale meccanismo nella risposta immunitaria ai virus. Una delle prime strategie ad essere stata individuata è la secrezione da parte dei poxvirus di fattori solubili che bloccano TNF (98). Molti altri virus sono in grado di rilasciare proteine che legando TNF ne impediscono l'interazione con il recettore. Gli adenovirus adottano invece una strategia molto più complessa. Infatti la regione E3 degli adenovirus codifica per una serie di proteine (RID) che internalizzano e degradano Fas, TRAILR1 e TRAILR2 (99) (100). In questa maniera l'esposizione di tali recettori sulla membrana plasmatica di cellule infettate è molto bassa se non assente. Anche la via di trasduzione a valle dei recettori di morte costituisce un buon bersaglio antiapoptotico. Numerosi herpesvirus, incluso KSHV, producono v-FLIP che è in grado di inibire l'attivazione della caspasi 8 e il segnale a valle dei recettori del TNF (101).



<b>INIBITORI VIRALI VIA INTRINSECA</b>	
<b>STRATEGIA</b>	<b>ESEMPIO</b>
inibitori p53	Large T antigen (SV40) proteina pX (virus epatite B) proteina E6 (papillomavirus) proteina E1B 55K (adenovirus)
omologhi funzionali Bcl-2	proteina E1B 19K (adenovirus) BHRF1 - BALF1 (EBV) KSbcl-2 (KSHV) UL37 (cytomegalovirus)
regolatori trascrizionali Bcl-2	proteina Tax (HTLV-1)
regolatori post-trascrizionali Bcl-2	Nef protein-chinasi (HIV-1) U(S)3 protein-chinasi (HSV-1)
inibitori caspasi	v-IAP (baculovirus) CrmA (poxvirus)
<b>INIBITORI VIRALI VIA ESTRINSECA</b>	
eliminazione dei recettori di morte	complessi proteici E3 (adenovirus)
omologhi solubili dei recettori	TNFR2 (poxvirus) proteina T2 (mixoma virus)
reclutamento proteine adattatrici	LMP1 (HSV-1)
inibizione caspasi 8	v-FLIP (herpes virus)

**Tabella 3. Strategie adottate dai virus per inibire la morte della cellula ospite.**



**Figura 10. Diverse strategie di sopravvivenza adottate dai virus. Si possono distinguere due principali modalità di infezione, una che mira alla persistenza più o meno lunga del virus, e l'altra che produce una proliferazione virale rapida. Le due strategie possono essere adottate in fasi diverse dell'infezione. Per ogni meccanismo sono riportati degli esempi.**

D'altro canto alcuni virus possono adottare una strategia diversa il cui scopo è quello di promuovere l'apoptosi ad un tasso più alto rispetto al normale (Fig. 10). Questo può facilitare il rilascio del virus e l'infettività, soprattutto nella ultima fase dell'infezione, o indurre immunodeficienza quando le cellule colpite siano quelle del sistema immunitario. Un caso eclatante di strategia "colpisci e fuggi" è mostrato dal virus Ebola, che nella manifestazione letale induce una massiccia morte apoptotica intravascolare (102). Molti virus sono in grado di aumentare l'espressione dei recettori di morte e dei loro ligandi. L'induzione del ligando di Fas o di TRAIL nella cellula infetta può costituire una ottima strategia per uccidere i CTL e le cellule dendritiche infiltranti, modulando la risposta immunitaria (103). Ad esempio TRAIL è indotta a seguito di infezione da citomegalovirus umano (HCMV), mentre FasL è espressa in presenza di virus dell'epatite c (HCV) (nei linfociti T) e di HCMV (cellule dendritiche) (103).

### 3.4.3 APOPTOSI E HIV

Una delle possibili strategie adottate dai virus per sfuggire alla risposta dell'ospite è l'induzione di immunodeficienza. A causa della sua drammatica attualità uno dei casi meglio studiati è la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) causata dal virus HIV (Human Immunodeficiency Virus). Il principale bersaglio cellulare dell'azione citolitica del virus HIV sono i linfociti CD4+. Nell'infezione da HIV si assiste nel sistema circolatorio ad un progressivo aumento delle cellule apoptotiche (104) ed a una diminuzione dei linfociti Th (105). La deplezione dei linfociti Th è dovuta in primo luogo all'infezione preferenziale proprio di tali cellule (e solo in misura minore macrofagi e cellule dendritiche). Il riconoscimento specifico tra virus e linfocita avviene grazie al legame tra la glicoproteina virale, Env, e la proteina CD4 dei linfociti, insieme con il recettore CXCR4 o CCR5 (106). Sono diversi i meccanismi proposti per spiegare l'uccisione diretta del linfocita da parte del virus. Oltre agli usuali meccanismi di tossicità indotti da virus, l'espressione delle proteine virali, tra cui Env, sulla membrana plasmatica dei linfociti potrebbe facilitare il fenomeno ben conosciuto della formazioni di sincizi cellulari. I sincizi hanno vita breve e la loro formazione correla con la deplezione dei linfociti Th (107) (108). In aggiunta la morte della cellula potrebbe essere la conseguenza di una maggiore permeabilità di membrana dovuta all'inserzione di proteine virali, quali Vpu (109).

Il virus HIV può indurre la morte della cellula ospite anche come attiva strategia di infezione. Sono molte le proteine sintetizzate dal genoma virale ad essere state implicate nell'induzione dell'apoptosi (Tab. 4). Tale fenomeno oltre a permettere la dispersione virale, offre, tramite la deplezione dei linfo-

citi T un vantaggio per la sopravvivenza complessiva del virus. Il virus HIV produce una proteasi che è in grado di tagliare ed inattivare Bcl-2 e di attivare la pro-caspasi 8, rendendo la cellula più suscettibile alla morte regolata dal mitocondrio sia nella via estrinseca che intrinseca (110) (111). La via mitocondriale viene deregolata in presenza di HIV, anche per mezzo di un aumento dei livelli di Bax (112) e Bim (113). Un ruolo fondamentale nella modulazione delle proteine della famiglia di Bcl-2 sembra essere svolto dalla proteina virale Tat. Inoltre sia i linfociti CD4+ che CD8+ prelevati da pazienti infetti da HIV sono più sensibili alla morte per apoptosi in risposta a Fas-L. Tale fenomeno sembra essere correlato ad una maggiore espressione di Fas (114). Le proteine di origine virale Nef (115), Env (116), e Tat (117) sono state associate alla capacità di far aumentare l'espressione di Fas e Fas-L sui linfociti.

PROTEINA VIRALE	MECCANISMO
Tat	aumento di Fas e Fas-L aumento di Bax, Bim diminuzione di Bcl-2
Nef Vpu	aumento di Fas e Fas-L apertura varchi sulla membrana maggiore suscettibilità a Fas
Env (gp120/gp160)	aumento di Fas e Fas-L formazione di sincizi diminuzione Bcl-2
Proteasi	attivazione di morte dipendente da CD4 attivazione della caspasi 8 degradazione di Bcl-2

**Tabella 4. Modulazione dell'apoptosi da parte delle proteine di HIV.**

L'apoptosi gioca un ruolo fondamentale anche nell'eliminazione delle cellule non infettate. Infatti si è osservato che il numero di linfociti apoptotici è generalmente molto più elevato di quelli infettati dal virus e tale fenomeno è evidente soprattutto nei linfonodi (118). Le cellule "spettatrici" possono essere uccise attraverso due meccanismi: tramite proteine virali rilasciate dalle cellule infettate, o per AICD. Virioni inattivati (119) e proteine virali rilasciate nell'ambiente extracellulare quali gp120, Tat, Nef e Vpu, possono causare la morte delle cellule non infettate. La proteina gp120 è in grado di fare da ponte tra diverse molecole di CD4+, ma questo segnale in assenza di legame contemporaneo del TCR risulta in una attivazione solo parziale del linfocita che muore per apoptosi (120). La proteina virale gp120 sia nella forma solubile che legata alla membrana è un potente induttore dell'apoptosi. Infatti essa attiva sia la via di Fas (aumento di Fas/Fas-L, diminuzione di FLIP) che

la via mitocondriale (aumento di Bax e diminuzione di Bcl-2) (121). La proteina Tat può invece svolgere la propria azione apoptotica sulle cellule non infettate solo se endocitata da queste (122). Le proteine Nef e Vpu sembrano avere la capacità di inserirsi nella membrana plasmatica della cellula bersaglio e modificarne la permeabilità (123). L'AICD è quel meccanismo che permette il controllo omeostatico dei linfociti T durante una risposta immunitaria. Lo scopo principale dell'AICD è di far tornare a valori basali i livelli di linfociti ma solo dopo che l'infezione è terminata. A seguito della corretta attivazione il linfocita T entra in una fase di relativa insensibilità all'apoptosi che termina solo dopo qualche giorno. Si è osservato che in presenza di infezione da HIV l'AICD può non realizzarsi correttamente. Infatti il legame tra CD4 e Env prima della corretta attivazione del linfocita previene l'espressione dell'inibitore della caspasi 8, FLIP, bloccando l'ingresso nella fase di insensibilità all'apoptosi (124). La proteina gp120 sarebbe in grado di fare da ponte tra diverse molecole di CD4+, ma questo segnale in assenza di legame contemporaneo del TCR con un antigene risulta in una attivazione solo parziale del linfocita che muore per apoptosi (120).

## 4 Ipersensibilità e malattie autoimmuni

### 4.1 Caratteristiche generali

Per autoimmunità si intende lo sviluppo di una risposta immunitaria rivolta verso antigeni propri dell'organismo. Il sistema immunitario è strutturato in maniera tale che il rischio di sviluppare una forma di autoimmunità è insito nei suoi stessi meccanismi di funzionamento. Due sono le principali minacce al controllo dell'autoimmunità: la perdita della tolleranza e le conseguenze dell'ipersensibilità. In ambedue i casi assistiamo alla generazione incontrollata del repertorio di TCR e BCR con la possibilità di innescare una risposta che porta alla distruzione del tessuto colpito. I meccanismi di tolleranza centrale e periferica permettono l'eliminazione dei linfociti che hanno maggiore affinità per molti degli antigeni propri e il controllo di quelli che hanno bassa affinità. Oggi si ritiene che risposte autoimmuni transienti siano abbastanza frequenti ma non in grado di causare danni evidenti. L'insorgenza patologica dell'autoimmunità si realizza solo in presenza di uno stato di attivazione immunitario prolungato come quello che si può verificare nelle reazioni di ipersensibilità. Infatti tra le cause ipotizzate per l'autoimmunità ci sono anche le infezioni. Le malattie autoimmuni seguono la stessa classificazione usata per i fenomeni di ipersensibilità (Tab. 5) con l'eccezione dell'assenza del tipo I.

### 4.2 Classificazione

Le malattie autoimmuni sono classificate in base al tipo di risposta immunitaria prevalente. Un secondo elemento di classificazione riguarda l'estensione della patologia che può essere sistemica o organo-localizzata. Quando la malattia autoimmune è causata dalla presenza di anticorpi autoreattivi (autoimmunità di tipo II e III), è possibile risalire all'antigene scatenante. Nell'anemia emolitica autoimmune anticorpi rivolti verso gli antigeni di superficie degli eritrociti innescano una diffusa lisi mediata dal complemento, mentre nella milza si osserva un'intensa attività di fagocitosi degli eritrociti. L'organo più colpito è la milza dove si stabilisce un processo infiammatorio cronico con richiamo di neutrofili e macrofagi che genera danni molto estesi. Quando gli anticorpi sono diretti verso recettori di membrana, essi si

PATOLOGIA	AUTO-ANTIGENE	SINTOMI	ESTENSIONE
<b>TIPO II: ANTICORPI VERSO ANTIGENI DI SUPERFICIE</b>			
anemia emolitica autoimmune	antigeni Rh	lisi dei globuli rossi	L (milza)
sindrome di Goodpasture	collagene IV	glomerulonefrite	L
sindrome di Grave	recettore TSH	ipertiroidismo	L
Miastenia gravis	recettore acetilcolina	debolezza muscolare	L
<b>TIPO III: FORMAZIONE IMMUNOCOMPLESSI</b>			
artrite reumatoide	complessi IgG per il fattore reumatoide	artrite	S
spondilite reumatoide	ND	danni alle vertebre	S
lupus eritematoso	DNA, istoni, ribosomi, ribonucleoproteine	glomerulonefriti infiammazioni cutanee vasculiti	S
<b>TIPO IV: RISPOSTA MEDIATA DA LINFOCITI T</b>			
sclerosi multipla	proteina basica della mielina	linfociti infiltranti nel cervello, debolezza	S
diabete mellito	antigene delle cellule beta	distruzione isole pancreatiche	L
artrite reumatoide	antigene delle sinovie	infiammazione e distruzione legamenti	S

**Tabella 5. Classificazione delle malattie autoimmuni (L=locale, S=sistemica)**

possono comportare da attivatori o da inibitori producendo un quadro clinico in cui all'autoimmunità si associano caratteristiche disfunzioni. Nella malattia di Grave si assiste alla attivazione costitutiva del recettore tiroideo per TSH con conseguente rilascio di ormone tiroideo e ipertiroidismo. Nella miastenia gravis gli anticorpi rivolti contro il recettore dell'acetilcolina bloccano la segnalazione ai muscoli con la generazione di una progressiva debolezza muscolare. Nei casi sinora discussi si assiste alla produzione di anticorpi rivolti verso uno o pochi antigeni ed a manifestazioni cliniche confinate in singoli organi. Nell'SLE la produzione di un gran numero di anticorpi produce danni tissutali in tutto il corpo (danni sistemici). La sintomatologia dell'SLE è complicata dal fatto che si ha la formazione di immunocomplessi, generando un quadro clinico che comprende una ipersensibilità anche di tipo III. Nelle autoimmunità di tipo IV si assiste ad un danno tissutale che è riconducibile all'azione dei linfociti T. In questo caso è molto difficile identificare l'antigene scatenante ed isolare il clone linfocitario responsabile della risposta autoimmune. Sono compresi in questa categoria la sclerosi multipla, l'artrite reumatoide (anche di tipo III) e il diabete mellito.

### 4.3 Meccanismi

L'apoptosi può giocare un ruolo importante nelle malattie autoimmuni sotto due diversi aspetti. Da una parte difetti nella realizzazione dell'apoptosi durante la delezione centrale e periferica permettono la persistenza e la proliferazione di linfociti autoreattivi che possono scatenare una risposta di natura autoimmune e contemporaneamente dar vita a linfoproliferazione non maligna. L'altra ipotesi è che la causa scatenante sia indipendente dal ruolo dei linfociti e basata su un'eccessiva mortalità in un determinato tessuto. Le manifestazioni di ipersensibilità sarebbero in questo caso solo secondarie e determinate da uno stato di infiammazione cronica. Nel diabete di tipo I è stato ad esempio proposta l'esistenza di difetti nel funzionamento di Fas a carico delle isole pancreatiche (125). Quest'ultime osservazioni sono ancora oggetto di un acceso dibattito e più recentemente sono stati presentati dati che tendono a ridimensionare tale ipotesi (126) (127). La ricerca di mutazioni genetiche come agente causale di difetti apoptotici nel sistema immunitario ha finora ottenuto risultati positivi solo per quanto riguarda il sistema Fas/Fas-L. Sia nei modelli murini che nell'uomo tali mutazioni sembrano essere associate prevalentemente a sindromi linfoproliferative di tipo autoimmune (vedi). Sebbene ciò indichi una stretta correlazione tra Fas e autoimmunità la ricerca di mutazioni nei pazienti non ha finora fornito i risultati attesi. Solo una rara forma di SLE presenta ad esempio linfoproliferazione diffusa e una mutazione identificabile su Fas-L (128). La maggioranza dei pazienti affetti da SLE non ha mutazioni su Fas-L e presenta una sensibilità alla morte dei linfociti che è normale (129). La stessa linfoproliferazione non è necessariamente legata all'insorgenza delle malattie autoimmuni. Sebbene la perdita della tolleranza sia considerata la principale causa di tali patologie i dati in nostro possesso ci permettono di formulare ipotesi solo sulla base di fattori di rischio potenziali.

#### *polimorfismo HLA*

Alcuni alleli HLA sia di classe I che II sono più frequenti in pazienti con malattie autoimmuni. L'ipotesi proposta è che certi alleli MHC potrebbero presentare sia con maggiore che con minore efficienza gli antigeni ai linfociti in maturazione. L'allele B27 (classe I) è associato ad un aumento di 80 volte della possibilità di sviluppare spondilite reumatoide, patologia caratterizzata da infiammazione e danno alla colonna dorsale. Nel diabete mellito si osserva un'alta frequenza degli alleli DR3 e DR4. Al contrario chi esprime l'allele DR2 molto raramente sviluppa il diabete anche in presenza di DR3 e DR4. Gli studi effettuati sulle proteine codificate da tali alleli hanno portato a scoprire che il complesso MHC II che si forma sembra essere meno stabile

e con una efficienza di legame ai peptidi molto bassa. Per tale motivo è stato proposto che la selezione negativa dei linfociti T rivolti contro le cellule beta del pancreas avvenga nel timo con minore efficienza portando ad un aumento del rischio di sviluppare la malattia che è stato valutato nell'ordine delle 25 volte. Ciononostante studi condotti sui gemelli hanno dimostrato solo il 20% di convergenza patologica tra fratelli per malattie quali il diabete mellito, l'artrite reumatoide e SLE. Questo ci fa ritenere che l'assetto genetico sebbene importante non è l'unico fattore di rischio delle malattie autoimmuni.

### *Ormoni*

Per molte malattie autoimmuni vi è una significativa differenza nell'incidenza tra i sessi. Le femmine sviluppano con maggiore frequenza diverse malattie autoimmuni. La tiroidite di Hashimoto è 50 volte più frequente nelle femmine che nei maschi, SLE circa 10 volte e l'artrite reumatoide 4 volte. Al contrario gli uomini sviluppano raramente malattie autoimmuni con una frequenza maggiore che nelle femmine. Tra queste ricordiamo la spondilite reumatoide. Le ragioni di tale differenza non sono chiare, ma recenti evidenze che legano il fenomeno della immuno-deviazione (vedi) all'azione di analoghi degli androgeni o degli estrogeni fanno ritenere che l'assetto ormonale possa influenzare pesantemente la risposta immunitaria nei due sessi.

### *Esposizione ad antigeni nascosti*

In presenza di una massiccia mortalità di tipo necrotico, o di una disfunzione nell'eliminazione delle cellule apoptotiche vi è il rilascio di antigeni che normalmente non vengono controllati né dalla delezione clonale né dall'anergia. Molti degli antigeni esposti potrebbero inoltre rientrare tra quelli soggetti a ignoramento immunologico (vedi). Tali antigeni una volta rilasciati in grande quantità possono quindi innescare una risposta immunitaria in quei linfociti sfuggiti alla selezione clonale. Una dimostrazione sperimentale di tale fenomeno è osservabile iniettando cellule singeniche apoptotiche nel topo. In tale situazione si assiste alla produzione di auto-anticorpi rivolti contro il DNA sia a doppio che a singolo filamento (130).

### *Infezioni*

Molti pazienti con diabete mellito hanno precedentemente sofferto di una infezione da coxsackie virus. L'encefalite autoimmune può essere indotta sperimentalmente immunizzando verso la proteina basica della mielina ma solo se si inietta contemporaneamente anche il vaccino del *Mycobacterium tuberculosis*. Si ritiene che la presenza di un agente infettivo permetta l'attivazione delle APC, con espressione del coattivatore B7, e che solo in queste condizioni linfociti T autoreattivi possano evitare l'anergia. In altri casi si ritiene che l'infezione possa indurre autoimmunità tramite un meccanismo di mime-



tismo molecolare. L'esempio classico è rappresentato dalla febbre reumatica a seguito dell'infezione da *Streptococcus pyogenes*. Anticorpi diretti verso antigeni del batterio sono in grado di legare anche tessuti del cuore danneggiandoli. Il danno patologico è di solito temporaneo in quanto i linfociti organizzano una risposta verso l'agente infettivo e non verso i tessuti propri, e quindi la risposta di tipo autoimmune scompare una volta debellata l'infezione.

## 4.4 Sindrome linfoproliferativa autoimmune

Le prime descrizioni di condizioni patologiche caratterizzate da linfoadenopatia non maligna associata a fenomeni di autoimmunità (ALPS, Autoimmune LymphoProliferative Syndrome) risalgono alla fine degli anni '60 (131). La scoperta delle basi genetiche di tale patologia è degli anni '90 a seguito degli studi condotti sui topi *lpr* (72). Nell'uomo l'ALPS si manifesta con gradi di severità molto diversi e viene generalmente classificata per mezzo dell'analisi funzionale della sensibilità all'apoptosi dei linfociti T. I linfociti prelevati da pazienti con ALPS possono essere per nulla (ALPS di tipo 0), parzialmente (ALPS di tipo I e II) o completamente (ALPS di tipo III) sensibili all'apoptosi da Fas. Le caratteristiche fenotipiche e le cause genetiche associate ai diversi tipi di ALPS sono molto diverse (Tab. 6). Comunque possiamo affermare che la sintomatologia dell'ALPS può essere basata sulla presenza di quattro distinte manifestazioni patologiche:

- sindrome tumorale (splenomegalia o linfoadenopatia)
- manifestazione autoimmune
- ipergammaglobulinemia
- presenza nel sangue di linfociti T CD4-CD8-

La maggioranza dei pazienti con ALPS presenta almeno tre delle condizioni illustrate.

Finora sono pochissimi i casi riportati di pazienti con ALPS di tipo 0. La completa assenza di Fas determina linfoproliferazione molto evidente con quadro patologico severo. In un caso è stata descritta la cura tramite trapianto allogenico del midollo osseo, indicando che le conseguenze principali della mancanza di Fas siano prevalentemente ristrette alle cellule di origine ematopoietica (132). Pazienti con ALPS I presentano un fenotipo simile ai rari casi di ALPS II. Un importante aspetto comune a tutti questi pazienti è la scarsa sensibilità alla morte apoptotica mediata da Fas dei linfociti T e B, mentre i linfociti T attivati esprimono livelli normali di Fas. Inoltre si osserva una scarsa propensione alla realizzazione della morte dei linfociti T indotta da attivazione (AICD). La gravità della patologia varia da caso a caso. La

linfoproliferazione determina un accumulo di linfociti T policlonali non maligni, di cui molti sono CD4-CD8-, e in alcuni casi anche di linfociti B. Molti di tali linfociti appaiono attivamente proliferanti. Una caratteristica tipica dell'ALPS I è l'aumento di IL10 nel plasma. Contemporaneamente si assiste ad una ridotta produzione di IL12 che lascia pensare all'esistenza di un meccanismo di regolazione secondaria che tenta di bilanciare la persistenza e l'attivazione di cloni autoimmuni. Nella maggior parte dei casi si assiste alla presenza di autoimmunità severa che richiede una terapia immunosoppressiva aggressiva. L'autoimmunità è di tipo sistemico ed è associata alla presenza di auto-anticorpi, ma mai rivolti verso DNA.

I pazienti affetti da ALPS II non presentano mutazioni a carico del gene Fas. La caccia a mutazioni in potenziali geni che regolano l'apoptosi a valle di Fas ha portato a scoprire in maniera inaspettata che la proteina coinvolta nell'ALPS II è la caspasi 10. Sebbene si ritenga che la principale caspasi attivatrice a valle dei TNFR sia la caspasi 8, studi recenti portano a ritenere che non solo la caspasi 10 sia presente nei DISC ma che sia capace di iniziare l'apoptosi anche in assenza di caspasi 8 (133).

ALPS	GENOTIPO	COMPARSA/GRAVITA'	DIFETTO MOLECOLARE
0	Mutazione nel gene Fas in omozigosi	Prenatale/severa	Mancata espressione di Fas o espressione di fas non funzionale
I	Mutazione in eterozigosi nel gene Fas o Fas-L(?)	Postnatale/moderata-severa, autoimmunità (Lupus eritematoso)	Parziale funzionamento di Fas
II	Mutazioni nel gene della caspasi 10	Postnatale/moderata, autoimmunità	Parziale funzionalità dei TNFR
III	?	Postnatale/moderata, autoimmunità	?

**Tabella 6. Classificazione delle sindromi linfoproliferative autoimmuni nell'uomo.**

La classificazione operata attraverso l'uso di anticorpi che attivano Fas esclude la presenza di difetti in altri recettori apoptotici o in Fas-L. Sebbene la casistica presente sia ancora molto limitata, tali situazioni vengono classificate come ALPS di tipo III. La ricerca di mutazioni nei pazienti affetti da ALPS non ha dato sinora risultati. L'assenza di mutazioni ereditabili nell'uomo, al contrario di ciò che avviene nel topo, può essere interpretata in diversi modi: la presenza di Fas-L è più importante nello sviluppo embrionale dell'uomo che nel topo; la non funzionalità di Fas-L può condurre a patologie con sintomatologia completamente diversa o che mascherano quelle tipiche dell'ALPS; è possibile che esista nell'uomo un ulteriore ligando di Fas non ancora individuato.

Le diverse forme di ALPS sembrano essere associate soprattutto a un difetto nella realizzazione della tolleranza periferica. Come dimostrato nei topi *lpr* la selezione negativa dei linfociti T nel timo sembra avvenire regolarmente (134). Inoltre nei pazienti affetti da ALPS i cloni linfocitari autoreattivi sono meno sensibili all'AICD rispetto ai cloni linfocitari rivolti verso antigeni esogeni. Tale evidenza fa ritenere che il sistema Fas/Fas-L sia importante soprattutto nella rimozione tramite AICD a seguito della esposizione cronica ad autoantigeni.

## 5 Bibliografia

1. Lockshin RA, Williams CM. Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol* 1965;11:123-33.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
3. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335(6189):440-2.
4. Rose S. Precis of "Lifelines: biology, freedom, determinism". *Behav Brain Sci* 1999;22(5):871-85; discussion 885-921.
5. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998;273(5):2926-30.
6. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(3-4):193-209.
7. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356(6367):314-7.
8. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000;256(1):19-26.
9. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
10. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999;18(45):6145-57.
11. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996;87(4):619-28.
12. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 2000;10(19):1201-4.
13. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003;4(12):1191-8.
14. Khaled AR, Durum SK. Death and Baxes: mechanisms of lymphotropic cytokines. *Immunol Rev* 2003;193:48-57.

15. Wen R, Wang D, McKay C, Bunting KD, Marine JC, Vanin EF, et al. Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol* 2001;21(2):678-89.
16. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998;17(6):1675-87.
17. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94(4):481-90.
18. Miller LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 1999;9(8):323-8.
19. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102(1):33-42.
20. Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 2000;192(4):557-64.
21. Kirberg J, Berns A, von Boehmer H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* 1997;186(8):1269-75.
22. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol* 2001;22(10):564-71.
23. Akashi K, Kondo M, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Weissman IL. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 1997;89(7):1033-41.
24. Mogil RJ, Radvanyi L, Gonzalez-Quintial R, Miller R, Mills G, Theofilopoulos AN, et al. Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo. *Int Immunol* 1995;7(9):1451-8.
25. Inaba M, Kurasawa K, Mamura M, Kumano K, Saito Y, Iwamoto I. Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J Immunol* 1999;163(3):1315-20.
26. Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 2003;4(7):680-6.
27. Van Parijs L, Refaeli Y, Abbas AK, Baltimore D. Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity* 1999;11(6):763-70.
28. Hamann KJ, Vieira JE, Halayko AJ, Dorscheid D, White SR, Forsythe SM, et al. Fas cross-linking induces apoptosis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(3):L618-24.
29. Bonfoco E, Stuart PM, Brunner T, Lin T, Griffith TS, Gao Y, et al. Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* 1998;9(5):711-20.

30. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101(4):890-8.
31. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390(6658):350-1.
32. Stern M, Savill J, Haslett C. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol* 1996;149(3):911-21.
33. Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, Galati G, Nebbia G, Tincani A, et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. II. Role of beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* 1998;41(2):215-23.
34. Seino K, Kayagaki N, Fukao K, Okumura K, Yagita H. Rejection of Fas ligand-expressing grafts. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1092-3.
35. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 1999;20(1):46-52.
36. Shimizu M, Fontana A, Takeda Y, Yoshimoto T, Tsubura A, Matsuzawa A. Fas/Apo-1 (CD95)-mediated apoptosis of neutrophils with Fas ligand (CD95L)-expressing tumors is crucial for induction of inflammation by neutrophilic polymorphonuclear leukocytes associated with antitumor immunity. *Cell Immunol* 2001;207(1):41-8.
37. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998;5(7):551-62.
38. Dini L, Carla EC. Hepatic sinusoidal endothelium heterogeneity with respect to the recognition of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 1998;240(2):388-93.
39. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, et al. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells *in vivo*. *J Exp Med* 2000;192(3):359-66.
40. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 1998;188(12):2313-20.
41. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 1997;272(49):31113-7.
42. Savill J. Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998;392(6675):442-3.
43. Sambrano GR, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged and

- apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(5):1396-400.
44. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998;392(6675):505-9.
  45. Diez-Roux G, Lang RA. Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. *Development* 1997;124(18):3633-8.
  46. Duffield JS, Erwig LP, Wei X, Liew FY, Rees AJ, Savill JS. Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J Immunol* 2000;164(4):2110-9.
  47. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 2000;403(6766):199-203.
  48. Kishimoto H, Surh CD, Sprent J. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1998;187(9):1427-38.
  49. Merville P, Dechanet J, Desmouliere A, Durand I, de Bouteiller O, Garrone P, et al. Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med* 1996;183(1):227-36.
  50. Lee BJ, Reiter SK, Anderson M, Sarawar SR. CD28(-/-) mice show defects in cellular and humoral immunity but are able to control infection with murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 2002;76(6):3049-53.
  51. Kirchhoff S, Muller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 2000;165(11):6293-300.
  52. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995;3(1):87-98.
  53. Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 2001;15(3):445-55.
  54. Hendriks J, Xiao Y, Borst J. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* 2003;198(9):1369-80.
  55. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270(5239):1189-92.
  56. Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 1996;5(1):7-16.

57. Sabelko-Downes KA, Cross AH, Russell JH. Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1999;189(8):1195-205.
58. Batteux F, Lores P, Bucchini D, Chiocchia G. Transgenic expression of Fas ligand on thyroid follicular cells prevents autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2000;164(4):1681-8.
59. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998;282(5394):1714-7.
60. Elzey BD, Griffith TS, Herndon JM, Barreiro R, Tschopp J, Ferguson TA. Regulation of Fas ligand-induced apoptosis by TNF. *J Immunol* 2001;167(6):3049-56.
61. Deng C, Goluszko E, Christadoss P. Fas/Fas ligand pathway, apoptosis, and clonal anergy involved in systemic acetylcholine receptor T cell epitope tolerance. *J Immunol* 2001;166(5):3458-67.
62. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;191(3):411-6.
63. Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Kuroki M, Shijo H, Tamura K. Unresponsiveness of peripheral T cells induced by apoptotic bodies derived from autologous T cells. *Cell Immunol* 1999;193(2):147-54.
64. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994;369(6475):31-7.
65. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* 2001;276(46):43285-93.
66. Sutton VR, Vaux DL, Trapani JA. Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 1997;158(12):5783-90.
67. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, et al. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* 2000;192(10):1403-14.
68. Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, et al. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(23):10854-8.
69. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75(6):1169-78.
70. Anel A, Buferne M, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM, Golstein P. T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones



- is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol* 1994;24(10):2469-76.
71. Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, Shinohara N, Matsuzawa A, Nishimura Y, et al. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(11):4930-4.
  72. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267(5203):1449-56.
  73. Li JH, Rosen D, Ronen D, Behrens CK, Krammer PH, Clark WR, et al. The regulation of CD95 ligand expression and function in CTL. *J Immunol* 1998;161(8):3943-9.
  74. Geiger B, Rosen D, Berke G. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* 1982;95(1):137-43.
  75. van Stipdonk MJ, Lemmens EE, Schoenberger SP. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2001;2(5):423-9.
  76. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2001;2(5):415-22.
  77. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, et al. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 1999;17:221-53.
  78. Schmitz I, Weyd H, Krueger A, Baumann S, Fas SC, Krammer PH, et al. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol* 2004;172(4):2194-200.
  79. Sandalova E, Wei CH, Masucci MG, Levitsky V. Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(9):3011-6.
  80. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003;300(5617):337-9.
  81. Sun JC, Williams MA, Bevan MJ. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 2004;5(9):927-33.
  82. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensing SJ, Ehst BD, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 2005;434(7029):88-93.
  83. Karre K, Welsh RM. Viral decoy vetoes killer cell. *Nature* 1997;386(6624):446-7.
  84. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physio-

- logic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1996;84(3):431-42.
85. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 1996;84(3):443-50.
  86. Darnell JE, Jr. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18(8):549-54.
  87. Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, Barber GN. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *Embo J* 1998;17(23):6888-902.
  88. Roth W, Weller M. Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol Life Sci* 1999;56(5-6):481-506.
  89. Tsushima H, Imaizumi Y, Imanishi D, Fuchigami K, Tomonaga M. Fas antigen (CD95) in pure erythroid cell line AS-E2 is induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha and potentiates apoptotic death. *Exp Hematol* 1999;27(3):433-40.
  90. Balachandran S, Roberts PC, Kipperman T, Bhalla KN, Compans RW, Archer DR, et al. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol* 2000;74(3):1513-23.
  91. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, et al. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999;163(2):920-6.
  92. Henry H, Thomas A, Shen Y, White E. Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. *Oncogene* 2002;21(5):748-60.
  93. Sundararajan R, White E. E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *J Virol* 2001;75(16):7506-16.
  94. Tsukahara T, Kannagi M, Ohashi T, Kato H, Arai M, Nunez G, et al. Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J Virol* 1999;73(10):7981-7.
  95. Clem RJ. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 2001;8(2):137-43.
  96. Shi Y. A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ* 2002;9(2):93-5.
  97. Miura M, Friedlander RM, Yuan J. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(18):8318-22.

98. Reading PC, Khanna A, Smith GL. Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology* 2002;292(2):285-98.
99. Tollefson AE, Hermiston TW, Lichtenstein DL, Colle CF, Tripp RA, Dimitrov T, et al. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* 1998;392(6677):726-30.
100. Benedict CA, Norris PS, Prigozy TI, Bodmer JL, Mahr JA, Garnett CT, et al. Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2. *J Biol Chem* 2001;276(5):3270-8.
101. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997;386(6624):517-21.
102. Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot MC, Capron M, Lansoud-Soukate J, Debre P, et al. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* 1999;5(4):423-6.
103. Raftery MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H, Schonrich G. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* 2001;15(6):997-1009.
104. Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 1996;156(9):3509-20.
105. Fowke KR, D'Amico R, Chernoff DN, Pottage JC, Jr., Benson CA, Sha BE, et al. Immunologic and virologic evaluation after influenza vaccination of HIV-1-infected patients. *Aids* 1997;11(8):1013-21.
106. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med* 2001;134(9 Pt 1):761-76.
107. Sylwester A, Murphy S, Shutt D, Soll DR. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J Immunol* 1997;158(8):3996-4007.
108. Kimata JT, Kuller L, Anderson DB, Dailey P, Overbaugh J. Emerging cytopathic and antigenic simian immunodeficiency virus variants influence AIDS progression. *Nat Med* 1999;5(5):535-41.
109. Gonzalez ME, Carrasco L. Human immunodeficiency virus type 1 VPU protein affects Sindbis virus glycoprotein processing and enhances membrane permeabilization. *Virology* 2001;279(1):201-9.
110. Korant BD, Strack P, Frey MW, Rizzo CJ. A cellular anti-apoptosis protein is cleaved by the HIV-1 protease. *Adv Exp Med Biol* 1998;436:27-9.

111. Nie Z, Phenix BN, Lum JJ, Alam A, Lynch DH, Beckett B, et al. HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. *Cell Death Differ* 2002;9(11):1172-84.
112. Sastry KJ, Marin MC, Nehete PN, McConnell K, el-Naggar AK, McDonnell TJ. Expression of human immunodeficiency virus type I tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 1996;13(3):487-93.
113. Strack PR, Frey MW, Rizzo CJ, Cordova B, George HJ, Meade R, et al. Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(18):9571-6.
114. Silvestris F, Cafforio P, Frassanito MA, Tucci M, Romito A, Nagata S, et al. Overexpression of Fas antigen on T cells in advanced HIV-1 infection: differential ligation constantly induces apoptosis. *Aids* 1996;10(2):131-41.
115. Zauli G, Gibellini D, Secchiero P, Dutartre H, Olive D, Capitani S, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood* 1999;93(3):1000-10.
116. Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Cross-linking of CD4 molecules upregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha secretion. *Blood* 1994;84(8):2622-31.
117. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995;375(6531):497-500.
118. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med* 1995;1(2):129-34.
119. Esser MT, Bess JW, Jr., Suryanarayana K, Chertova E, Marti D, Carrington M, et al. Partial activation and induction of apoptosis in CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by conformationally authentic noninfectious human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2001;75(3):1152-64.
120. Marschner S, Hunig T, Cambier JC, Finkel TH. Ligation of human CD4 interferes with antigen-induced activation of primary T cells. *Immunol Lett* 2002;82(1-2):131-9.
121. Arthos J, Cicala C, Selig SM, White AA, Ravindranath HM, Van Ryk D, et al. The role of the CD4 receptor versus HIV coreceptors in envelope-mediated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 2002;292(1):98-106.
122. Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, et al. Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of

- uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3851-6.
123. Azad AA. Could Nef and Vpr proteins contribute to disease progression by promoting depletion of bystander cells and prolonged survival of HIV-infected cells? *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267(3):677-85.
  124. Somma F, Tuosto L, Gilardini Montani MS, Di Somma MM, Cundari E, Piccolella E. Engagement of CD4 before TCR triggering regulates both Bax- and Fas (CD95)-mediated apoptosis. *J Immunol* 2000;164(10):5078-87.
  125. Suarez-Pinzon W, Sorensen O, Bleackley RC, Elliott JF, Rajotte RV, Rabinovitch A. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes* 1999;48(1):21-8.
  126. Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Evidence that beta cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. *J Immunol* 1999;163(3):1562-9.
  127. Restifo NP. Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* 2000;6(5):493-5.
  128. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996;98(5):1107-13.
  129. Wong HK, Kammer GM, Dennis G, Tsokos GC. Abnormal NF-kappa B activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with decreased p65-RelA protein expression. *J Immunol* 1999;163(3):1682-9.
  130. Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med* 1998;188(2):387-92.
  131. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* 1967;70(6):891-9.
  132. Benkerrou M, Le Deist F, de Villartay JP, Caillat-Zucman S, Rieux-Laucat F, Jabado N, et al. Correction of Fas (CD95) deficiency by haploidentical bone marrow transplantation. *Eur J Immunol* 1997;27(8):2043-7.
  133. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001;276(49):46639-46.
  134. Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994;1(5):365-71.

# Indice

Editoriale .....	pag.	3
1 Introduzione .....	»	5
2 Caratteristiche generali dell'apoptosi .....	»	7
2.1 Modalità di morte cellulare .....	»	7
2.2 Vie di trasduzione del segnale .....	»	10
2.3 Meccanismi di controllo .....	»	13
3 Apoptosi e sistema immunitario .....	»	18
3.1 Eventi modulati dall'apoptosi .....	»	18
3.2 Risposta immunitaria .....	»	19
3.2.1 Omeostasi linfociti .....	»	19
3.2.2 Infiammazione acuta .....	»	22
3.2.3 Ruolo dei macrofagi .....	»	24
3.3 Tolleranza immunologica .....	»	27
3.3.1 Tolleranza centrale .....	»	27
3.3.2 Tolleranza periferica .....	»	29
3.4 Azione citotossica .....	»	33
3.4.1 Regolazione dei linfociti CTL .....	»	35
3.4.2 Infezioni virali .....	»	36
3.4.3 Apoptosi e HIV .....	»	40
4 Ipersensibilità e malattie autoimmuni .....	»	43
4.1 Caratteristiche generali .....	»	43
4.2 Classificazione .....	»	43
4.3 Meccanismi .....	»	45
4.4 Sindrome linfoproliferativa autoimmune .....	»	47
5 Bibliografia .....	»	50
Indice .....	»	60

# Caleidoscopio

Italiano

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D., Girelli M.E., Zanatta G.P., Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La  $\beta$ -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.

31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterin nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.



69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radio-nuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio '94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.

103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.
106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
117. Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.
121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.
123. Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.
124. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (I)*. Luglio '98.
125. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo I*. Novembre '98.
127. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II)*. Dicembre '98.
128. Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunostochimica*. Gennaio '99.
129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.
130. Castello G., Silvestri I.: *Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.
131. Aiello V., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata*. Aprile '99.
132. Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.
133. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Eosinofili*. Giugno '99.
134. Fusco A., Somma M.C.: *NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*. Luglio '99.
135. Chieffi O., Bonferraro G., Fimiani R.: *La menopausa*. Settembre '99.
136. Giglio G., Aprea E., Romano A.: *Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi*. Ottobre '99.

137. Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: *Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati*. Novembre '99.
138. Giovanella L.: *Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*. Dicembre '99.
139. Paladino M., Cerizza Tosoni T.: *Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*. Gennaio 2000.
140. La Vecchia C.: *Come evitare la malattia*. Febbraio 2000.
141. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Cellule dendritiche*. Marzo 2000.
142. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I)*. Aprile 2000.
143. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II)*. Maggio 2000.
144. Croce E., Olmi S.: *Videolaparoscopia*. Giugno 2000.
145. Martelli M., Ferraguti M.: *AllergoGest*. Settembre 2000.
146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: *TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici*. Gennaio 2001.
147. Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: *L'umanizzazione dei servizi sanitari*. Febbraio 2001.
148. Giovanella L.: *I tumori della tiroide*. Marzo 2001.
149. Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: *L'ipertensione arteriosa*. Aprile 2001.
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: *Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*. Settembre 2001.
151. Dominici R.: *Riflessioni su Scienza ed Etica*. Ottobre 2001.
152. Lenziardi M., Fiorini I.: *Linee guida per le malattie della tiroide*. Novembre 2001.
153. Fazii P.: *Dermatofiti e dermatofitosi*. Gennaio 2002.
154. Suriani R., Zanella D., Orso Giaccone G., Ceretta M., Caruso M.: *Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*. Febbraio 2002.
155. Trombetta C.: *Il Varicocele*. Marzo 2002.
156. Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: *Ambiente e polmone*. Aprile 2002.
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: *I Markers tumorali*. Maggio 2002.
158. Loviselli A., Mariotti S.: *La Sindrome da bassa T3*. Giugno 2002.
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giaccone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte*. Ottobre 2002.
160. Canini S.: *Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato*. Novembre 2002.
161. Atzeni M.M., Masala A.: *La  $\beta$ -talassemia omozigote*. Dicembre 2002.
162. Di Serio F.: *Sindromi coronariche acute*. Gennaio 2003.
163. Muzi P., Bologna M.: *Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*. Febbraio 2003.
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: *Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*. Marzo 2003.
165. Magri G.: *Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*. Aprile 2003.
166. Rapporto dello Hastings Center: *Gli scopi della medicina: nuove priorità*. Maggio 2003.
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: *Il sonno e le sue alterazioni*. Giugno 2003.
168. Macchia V., Mariano A.: *Marcatori tumorali nel cancro della vescica*. Luglio 2003.
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: *La Tuberculosis Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.

170. Aebischer T.: *Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*. Settembre 2003.
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: *Il manuale della sicurezza*. Ottobre 2003.
172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione*. Novembre 2003.
173. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: *Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee*. Dicembre 2003.
174. Savron G.: *Le Fobie*. Gennaio 2004.
175. Paganetto G.: *Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*. Febbraio 2004.
176. Giovanella L.: *Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*. Marzo 2004.
177. Severino G., Del Zompo M.: *Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata"*. Aprile 2004.
178. Arigliano P.L.: *Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie*. Maggio 2004.
179. Bruni A.: *Malattia di Alzheimer e Demenza Frontotemporale*. Giugno 2004.
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: *Eziopatogenesi e diagnostica allergologica*. Luglio 2004.
181. Franzoni E., Gualandi P., Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare*. Agosto 2004.
182. Grandi G., Peyron F.: *La toxoplasmosi congenita*. Settembre 2004.
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A.: *Patogeni emergenti e resistenze batteriche*. Ottobre 2004.
184. Tosello F., Marsano H.: *Scientific English Handout*. Novembre 2004.
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: *Iperensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
186. Paganetto G.: *Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*. Gennaio 2005.
187. Savron G.: *La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*. Febbraio 2005.
188. Magrì G., Baghino E., Florida M., Ghiara F.: *Leishmania*. Marzo 2005.
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., Pasina L.: *Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: *Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*. Maggio 2005.
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonese G.: *Aerobiologia ed allergopatie*. Giugno 2005.
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.: *Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12*. Luglio 2005.
193. Zepponi E.: *Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*. Settembre 2005.
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: *La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi*. Ottobre 2005.
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: *Doping e antidoping nello sport*. Novembre 2005.
196. Lozzi M.: *La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*. Dicembre 2005.

197. Bracco G.: *Progettare un Laboratorio di Analisi*. Gennaio 2006.

198. Angelucci A.: *Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*.  
Febbraio 2006.



I volumi disponibili su Internet nel sito [www.medicalsystems.it](http://www.medicalsystems.it) sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del *Caleidoscopio* che ormai sono “storiche”. Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: *Caleidoscopio* 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

**Caleidoscopio**  
**Rivista mensile di Medicina**  
anno 24, numero 198

**Direttore Responsabile**

Sergio Rasso  
Tel. mobile 338 2202502  
E-mail: sergiorasso@libero.it

**Progettazione e Realizzazione**



Restless Architect  
of Human Possibilities s.a.s.

**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

**Responsabile Ufficio Acquisti**

Giusi Cunietti

**Segretaria di Direzione**

Maria Speranza Giola  
Giovanna Nieddu

**Servizio Abbonamenti**

Maria Grazia Papalia  
Flavio Damarciasi

**EDITORE**

... il futuro ha il cuore antico  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)

Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);  
Telefax 010/8340310- 809070.

Internet URL: <http://www.medicalsystems.it>

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato,  
Caleidoscopio Letterario, Giornale della Associazione per l'Automazione del  
Laboratorio, Guida Pratica Immulite<sup>®</sup>, Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora,  
Tribuna Biologica e Medica.

**Stampa**

Tipolitografia Nuova ATA

Via Gelasio Adamoli, 281 - Genova

Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - [info@nuovaata.com](mailto:info@nuovaata.com) - [www.nuovaata.com](http://www.nuovaata.com)

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996

Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Febbraio 2006

Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e  
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento  
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:

"L'ECO DELLA STAMPA"

Via Compagnoni, 28 - Milano



## ***Prossimi Corsi ECM***

- 28-06-2006 Qualità nel Laboratorio Analisi. La Gestione del rischio nel Laboratorio Analisi. Bologna  
16-06-2006 Marcatori cardiaci. Napoli  
15-06-2006 Lezioni di Inglese Scientifico\_Mod. 2B. Genova  
08-06-2006 La gestione delle tecnologie nel laboratorio biomedico di un'azienda sanitaria. Genova  
08-06-2006 Giornate di Allergologia. Genova  
30-05-2006 Malattie a trasmissione materno fetale. Acqui (AL)  
26-05-2006 Nuovi approcci diagnostici alle malattie allergiche. Tricase (LE)  
25-05-2006 Nuovi approcci diagnostici alle malattie allergiche. Mesagne (BR)  
22-05-2006 Implementazione delle linee guida e dei percorsi diagnostici in laboratorio nella medicina sportiva. Acqui (AL)  
19-05-2006 Il supporto clinico e laboratoristico nella diagnostica delle sindromi coronariche acute. Catania  
19-05-2006 Conoscenza e gestione del clima organizzativo in ambiente sanitario. Verona  
18-05-2006 Modelli Matematici di crescita tumorale. Acqui (AL)  
17-05-2006 Conoscenza e gestione del clima organizzativo in ambiente sanitario. Adria (RO)  
16-05-2006 Screening Prenatali per aneuploidie e Difetti del Tubo Neurale: basi statistiche, alternative disponibili e organizzazione pratica. Fara in Sabina (RI)  
12-05-2006 Comunicazione verbale e non verbale. Lamezia Terme (CZ)  
12-05-2006 Il Farmaco e il Laboratorio Clinico. Milano  
12-05-2006 Dolore Toracico e Sindrome Coronarica Acuta: dalla teoria alla pratica. Bergamo  
11-05-2006 Cultura gestionale: il gruppo di lavoro e il lavoro di gruppo. Bonifati (CS)  
11-05-2006 La gestione delle tecnologie nel laboratorio biomedico di un'azienda sanitaria. Genova  
09-05-2006 Promozione della qualità della vita con la gestione dello stress in ambito sanitario. Caltagirone  
08-05-2006 Sviluppo di una cultura gestionale in Patologia clinica con i principi sulla Leadership ed il team building. Popoli (PE)  
08-05-2006 Cultura gestionale: il gruppo di lavoro e il lavoro di gruppo. Palermo  
05-05-2006 Cultura della Qualità e costi della "Non Qualità" in ambito sanitario. S. Miniato (PI)  
04-05-2006 Neoplasie Rino-Oro-Faringo-Laringee, oculari e melanomi: Prevenzione, diagnosi e terapia. Indicatori di neoplasie: Stato attuale e prospettive. Genova  
03-05-2006 Approfondimento teorico dei requisiti della Norma UNI EN ISO 9001:2000 applicati alla Medicina di Laboratorio. Terracina (LT)

*Sponsor Ufficiale*

*... il futuro ha il cuore antico*

**MEDICAL SYSTEMS S.p.A.**



Safari Archivio Composizione Vista Cronologia Preferiti Finestra Aiuto

Benvenuti in Medical Systems S.p.A.

http://www.medicalsystems.it/

HOME | AZIENDA | CONTATTI | NEWS

# MEDICAL SYSTEMS S.p.A.

di frontiera per il nuovo futuro

SERVIZI | PRODOTTI | ANALIZZATORI | REAGENTI | SOFTWARE | CORSI | EVENTI ECM | EDITORIA | IVD

### DISTRIBUZIONI ESCLUSIVE PER L'ITALIA DPC

**DPC** DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION

Medical Systems offre una vasta gamma di soluzioni per la gestione del Laboratorio Clinico. I nostri strumenti più di tutto progettati (Point of Care e Central) integrati agli analizzatori per l'emocromia e la Coagulazione, il software.

### CORSI

Conoscere le ultime tecnologie e le metodologie analitiche, apprendere sulle più recenti soluzioni di legge e di mercato nel mondo di laboratorio, valutare il contributo che gli strumenti analitici possono dare al miglioramento.

es.dmg@ms.it

### PRODOTTI IMMUNOMETRICI

In questo settore è necessario strumenti efficienti, precisi, veloci, a basso costo, che siano anche in grado di gestire un alto volume di analisi.

- ✓ **METODICHE**
- ✓ **SCHIVI DI SICUREZZA**
- ✓ **ELIMIO ALLERGENI**

### EVENTI ECM

Partecipare ai più importanti congressi, seminari, workshop, conferenze, corsi di aggiornamento, corsi di perfezionamento, corsi di specializzazione, corsi di aggiornamento, corsi di perfezionamento, corsi di specializzazione.

es.dmg@ms.it

### SOFTWARE PER LA GESTIONE DEL LABORATORIO D'ANALISI

IL NOSTRO SOFTWARE DI GESTIONE DEL LABORATORIO CLINICO (LIS) è progettato per la gestione di tutti i processi analitici.

- ✓ **DIAGNOSI**
- ✓ **PRELIEVO**
- ✓ **REALTIME SERVICE**

### EDITORIA SCIENTIFICA PER LA PROPRIA CLIENTELA

Il nostro editore scientifico fornisce la massima qualità e la più alta tecnologia di riferimento nel settore di riferimento.

- ✓ **CALENDARIO**
- ✓ **BRISER**
- ✓ **DIAGNOSTICA**
- ✓ **CLASS**
- ✓ **PARADIGMA**
- ✓ **DIAGNOSTICA PER IVD**

### PREANALITICA

Conoscere il ciclo di vita di un test di laboratorio, dalla fase pre-analitica alla fase analitica.

es.dmg@ms.it

**- IgG Allergene Specifiche!!!** **- NT-ProBNP!!!**

Medical Systems S.p.A. - Via. Via. Torino, 25 - 00198 Roma - Tel. 06.52441 - 44.44.44.44

In caso di mancato recapito, pregasi ritornare al mittente che pagherà la tassa dovuta.



€ 10,33