# 11. Generalia immunologica

*III edizione print edition*

*Luigi Barbieri*

 (vedi singoli sotto-capitoli)

11. Generalia immunologica....313
11.1. Inquadramento terminologico 315
*11.1.1. Definizioni principali....316*
*11.1.1. Vaiolo e concetto di vaccinazione....317*
11.2. Immunità naturale ed acquisita 318
*11.2.1. Immunità naturale....318*
*11.2.2. Immunità acquisita o specifica....319*
*11.2.3. Modello essenziale delle interazioni cellulari nella risposta immunitaria adattativa....320*
*11.2.4. Differenziamento leucocitario....321*
*11.2.5. Differenziamento linfocitario....322*
*11.2.6. Filogenesi dei meccanismi di difesa....323*
*11.2.7. Immunità specifica attiva e passiva....323*
*11.2.8. Risposta umorale e cellulo-mediata....324*
*11.2.9. Risposta umorale....325*
*11.2.10. Immunità cellulo-mediata....326*
*11.2.11. Valutazione clinica dello stato di immunità....327*
*11.2.12. Cellule ed immunità....327*
*11.2.13. Diverse funzioni di immunità umorale ed immunità cellulare....327*
11.3. I linfociti 328
*11.3.1. Sviluppo ed eterogeneità linfocitaria....328*
*11.3.2. Le molecole CD....329*
11.4. Linfociti B 330
11.5. Linfociti T 331
*11.5.1. Linfociti T e MHC....331*
*11.5.2. Meccanismo di uccisione da parte dei linfociti killer....332*
*11.5.3. Linfociti T helper: citochine, cellule attivate ed infezioni....333*
*11.5.4. Linfociti T regolatori (Treg)....334*
*11.5.5. Linfociti T citotossici....334*
*11.5.6. Cellule accessorie dell'immunità innata: innesco dell'immunità adattativa....335*
11.6. Le citochine: i messaggeri inter-cellulari 336
*11.6.1. Le principali interleuchine....336*
11.7. Anatomia funzionale del sistema immunitario 338



*11.7.1. Organi linfoidi primari e secondari....339*
*11.7.2. Immunità d'organo o di sistema....340*
*11.7.3. Ricircolo linfocitario....341*
*11.7.4. Midollo Osseo....343*
*11.7.5. Tessuto midollare differenziato....343*
*11.7.6. Il Timo....344*
*11.7.7. Timociti....345*
*11.7.8. Linfonodi....346*
*11.7.9. Milza....347*
*11.7.10. Altri tessuti linfoidi periferici....348*
11.8. Principali fonti utilizzate 349



## 11.1. Inquadramento terminologico

☞ Il termine immunità deriva dalla parola latina *immunitas*, che stava ad indicare l'esenzione da alcuni obblighi civili e dalla perseguibilità legale, che veniva attribuita ai senatori romani in carica

Storicamente in medicina immunità ha significato protezione dalle malattie, ed in particolare dalle malattie infettive

☞ Le cellule e le molecole coinvolte nell'immunità costituiscono il sistema immunitario, e la loro risposta organica rappresenta la risposta immunitaria

☞ I meccanismi implicati nel mantenimento della composizione interna dell'organismo umano sono unici indipendentemente dal fatto che la variazione abbia origine esogena o endogena

☞ Il mantenimento della identità strutturale comprende anche la rimozione di strutture endogene invecchiate e modificate

☞ Gli stessi meccanismi che proteggono normalmente l'individuo dalle infezioni e provvedono ad eliminare gli agenti esogeni sono in grado di causare a volte un danno tissutale e la comparsa di malattie



*Figura 11.1.* Senator Romanus. *Immagine di* public domain *da wikia.nocookie.net*



### 11.1.1. Definizioni principali

☞ Le definizioni riguardanti l'immunologia sono varie e riflettono la storia delle conoscenze scientifiche nel campo

**Definizioni di immunologia**

*L'immunologia è la scienza che studia l'immunità nei confronti degli agenti patogeni (definizione storica comune ma parziale)*

**Definizione di sistema immunitario**

*Il sistema immunitario è il senso chimico/fisico che verifica la composizione chimico/fisica (sotto forma di strutture complesse) dell'organismo, rispondendo di norma con la tolleranza o, più raramente, con il tentativo di eliminazione della struttura riconosciuta*

**Definizione di antigene**

*Gli antigeni sono molecole che vengono riconosciute dal sistema immunitario (sia innato che adattativo) tramite gli anticorpi od i recettori specifici dei linfociti*

**Definizioni di anticorpo**

*Gli anticorpi sono le proteine sieriche che mediano l'immunità umorale (cioè dovuta a prodotti solubili presenti nei fluidi corporei) nei confronti di specifici antigeni*

### 11.1.1. Vaiolo e concetto di vaccinazione

☞ La vaccinazione era già praticata dai medici arabi, durante l'età d'oro dell'Islam. Voltaire si domandava perché nei paesi cristiani non si praticasse questo efficace sistema utilizzato "dai mori" per combattere le epidemie

Nel 1718, Lady Wortley Montague, moglie dell'ambasciatore inglese ad Istanbul, fece conoscere la vaccinazione all'Inghilterra ed agli altri paesi europei

Gli antichi testi Jaina alludono già alla presenza dei batteri e i sistemi di igiene adottati da diverse popolazioni islamiche nel medioevo servivano appunto ad evitare il contagio



*Figura 11.2. Edward Jenner. Da nndb.com/people*

☞
- Edward Jenner, un medico inglese vissuto nella seconda metà del '700, notò che le mungitrici che avevano contratto e superato il vaiolo vaccino non si ammalavano mai della forma, molto più grave, di vaiolo umano
- Basandosi su questa osservazione, Jenner iniettò il materiale ricavato da una pustola di vaiolo vaccino nel braccio di un bambino di 8 anni; quando al ragazzo fu più tardi inoculato il virus del vaiolo, la malattia non si sviluppò, confermando la sua teoria: un esperimento del tutto inaccettabile in base ai criteri etici attuali

☞ Un eloquente attestato dell'importanza e dei progressi dell'immunologia è rappresentato dall'annuncio, nel 1980, che il vaiolo è stata la prima malattia infettiva completamente eradicata in tutto il mondo grazie ad un processo di vaccinazione

Infatti il virus del vaiolo umano è specifico per il genere *homo*, e, poiché l'uomo infetto malato costituisce l'unico serbatoio di infezione, in assenza accertata di casi di malattia, si può affermare che il virus si è estinto



## *11.2. Immunità naturale ed acquisita*

### 11.2.1. Immunità naturale

☞ L'immunità naturale è quantitativamente il sistema di gran lunga più importante nel neutralizzare potenziali agenti dannosi: è stato detto che il 99.9% dei contatti con organismi potenzialmente patogeni vengono neutralizzati da questo sistema

Componenti dell'immunità naturale (chiamata anche nativa o innata) sono:

- barriere fisiche
- cellule fagocitarie (macrofagi, leucociti polimorfonucleati neutrofili)
- leucociti polimorfonucleati eosinofili
- cellule *natural killer* (NK) e linfociti T *natural killer*
- linfociti B1 e Tγδ
- numerose molecole solubili

☞ I meccanismi di difesa innati (immunità innata):

- sono preesistenti all'esposizione agli agenti microbici o alle macromolecole estranee
- non vengono potenziati da questa esposizione
- possono essere altamente specifici per strutture molecolari molto diffuse in natura, indipendentemente dalla natura del microrganismo o della macromolecola che presenta le strutture sopraddette

### 11.2.2. Immunità acquisita o specifica

☞ L'immunità acquisita o specifica è costituita da meccanismi di difesa che:

- vengono indotti o stimolati dall'esposizione qualitativamente o quantitativamente diversa a strutture molecolari per lo più esogene
- sono strettamente specifici per le singole strutture molecolari
- aumentano in intensità e in efficacia ad ogni successiva esposizione a quella particolare struttura

☞ La risposta immunitaria specifica rappresenta una componente di un sistema integrato di difesa, in cui numerose cellule e molecole agiscono di concerto per garantire la difesa dell'ospite

Il sistema immunitario specifico ha due importanti caratteristiche proprie:

- *la memoria*
- *l'amplificazione*

#### Memoria immunologica

☞ Il sistema immunitario specifico "ricorda" ogni incontro con la molecola antigenica, così che incontri successivi stimolano meccanismi difensivi sempre più efficaci

Questa proprietà viene chiamata memoria immunologica, e costituisce la base della vaccinazione contro le malattie infettive

#### Amplificazione della risposta immunologica

☞ Il sistema immunitario specifico amplifica i meccanismi dell'immunità, e li focalizza a livello del sito di presentazione della molecola antigenica, aumentando la capacità di neutralizzare ed eliminare l'antigene



### 11.2.3. Modello essenziale delle interazioni cellulari nella risposta immunitaria adattativa

☞ Le cellule staminali leucocitarie si differenziano In

- linfociti B
- linfociti T
- cellule dendritiche presentanti gli antigeni (*dendritic antigen presenting cells*, APC)
- cellule *natural killer* (NK)
- macrofagi
- granulociti

☞ Gli antigeni vengono processati dalle cellule dendritiche, e frammenti peptidici vengono vengono presentati ai linfociti T $CD4^+$ e/o T $CD8^+$

L'attivazione dei linfociti $CD8^+$ induce la generazione di linfociti T citotossici (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) o linfociti T *killer*, oltre all'induzione di linfociti T citotossici $CD8^+$ citochine-produttori

La produzione di anticorpi nei confronti dello stesso antigene parte con il legame dell'antigene stesso al complesso del recettore del linfocito B che viene indotto a maturare in plasmacellula secernente anticorpi

I linfociti $CD4^+$ $T_H1$ o $T_H2$ attraverso la produzione di interleuchine IL-4, IL-5 o interferone-γ (IFN-γ) determinano la classe di anticorpi prodotta

Le cellule T regolatorie producono interleuchina-10 (IL-10) ed inducono la *down-regulation* dei linfociti T e B dopo l'eliminazione dell'antigene

## 11.2.4. Differenziamento leucocitario

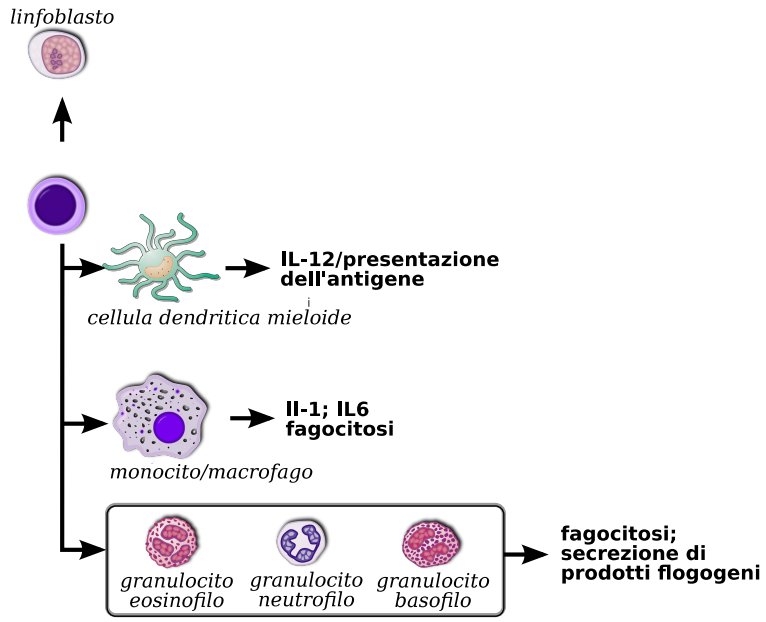



*Figura 11.3. Liberamente tratto da Haynes (2008)*

*IL: interleuchina; IFN: interferone; CTL:* cytotoxic T lymphocyte*; GM-CSF* granulocyte- macrophage colony stimulating factor*; TNF,* tumour necrosis factor



## 11.2.5. Differenziamento linfocitario

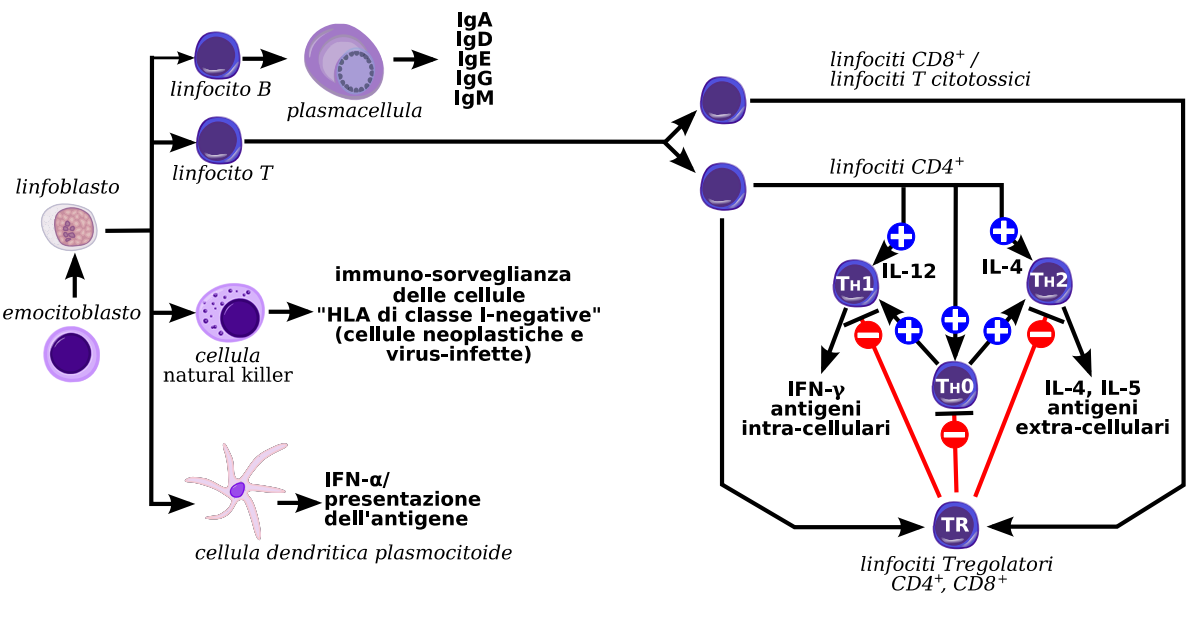



*Figura 11.4. Liberamente tratto da Haynes (2008)*

*IL: interleuchina; IFN: interferone; HLA:* human leucocyte antigen

### 11.2.6. Filogenesi dei meccanismi di difesa

☞ Prima dell'evoluzione dei vertebrati, le difese dell'ospite verso gli agenti esogeni erano affidate ai meccanismi dell'immunità naturale, tra cui i fagociti e alcune macromolecole solubili che presentano strette analogie con le componenti del sistema del complemento dei mammiferi

L'immunità specifica rappresentata dai linfociti e dagli anticorpi, compare solo nei vertebrati

### 11.2.7. Immunità specifica attiva e passiva

☞ Immunità attiva: indurre in un soggetto un'immunità che il soggetto stesso crea:

- le risposte immuni specifiche sono innescate quando un individuo si trova esposto ad una variazione antigenica quantitativa o qualitativa
- la forma di immunità indotta da questo processo di immunizzazione è denominata attiva perché l'individuo immunizzato partecipa attivamente alla risposta verso l'antigene, con tentativo di eliminazione dell'antigene stesso
- le vaccinazioni sfruttano questo processo

☞ Immunità passiva: conferimento di immunità specifica trasferendo in un individuo cellule o siero di soggetti specificamente immunizzati

- il ricevente di questo trasferimento adottivo diviene resistente (o immune) verso un particolare antigene, benché ad esso non sia mai stato esposto
- l'immunizzazione passiva costituisce un utile metodo per conferire resistenza rapidamente, senza dover attendere l'instaurarsi di una risposta immunitaria attiva
- la sieroprofilassi e la sieroterapia fanno parte di questo processo



### 11.2.8. Risposta umorale e cellulo-mediata

☞ Le risposte immuni specifiche possono essere classificate in due tipi:

- *immunità umorale*
  - gli effettori dell'immunità umorale sono sostanze solubili nei liquidi organici (anticamente umori): anticorpi ed altre sostanze solubili
- *immunità cellulo-mediata*
  - necessita della presenza di cellule effettrici

☞ Entrambe le risposte dipendono per il loro sviluppo dalla cooperazione di molti tipi cellulari diversi che nel loro insieme costituiscono l'unità morfo-funzionale chiamata sistema immunitario

☞ Entrambe le risposte di immunità specifica attiva hanno bisogno della collaborazione dei fenomeni legati all'immunità naturale nelle fasi in cui il processo può essere temporalmente e funzionalmente diviso:

- fase di innesco
- fase effettrice
- fase di spegnimento

## 11.2.9. Risposta umorale

☞ L'immunità umorale è mediata da molecole circolanti responsabili del riconoscimento specifico e dell'eliminazione dell'oggetto del riconoscimento (antigene), chiamate anticorpi



*Figura 11.5. I principali attori della storia degli studi sugli anticorpi: da sn. verso dx. Emil von Behring, Shibasabura Kitasato, Paul Ehrlich, Karl Landsteiner*

*Da: nobelprize.org, kajipon.sakura.ne.jp, National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, usuarios.cultura.com.br*

- *La definitiva dimostrazione sperimentale dell'esistenza dell'immunità umorale venne nel 1890 per opera di Emil von Behring e Shibasabura Kitasato: il trasferimento di siero da animali che avevano superato l'infezione difterica in animali vergini rendeva questi ultimi resistenti all'infezione*
- *Le componenti sieriche responsabili di questo fenomeno furono chiamate antitossine, dal momento che erano in grado di neutralizzare l'effetto patologico della tossina batterica*
- *Nel 1900, Paul Ehrlich prospettò un modello della specificità delle reazioni antigene-anticorpo*
- *La conferma sperimentale venne nei successivi 50 anni grazie al lavoro di Landsteiner e di altri ricercatori, impiegando come antigeni dei composti chimici semplici*
- *All'inizio del '900, Karl Landsteiner dimostrò che non solo le tossine, ma anche altre sostanze non batteriche erano in grado di indurre un'immunità umorale*



## 11.2.10. Immunità cellulo-mediata

☞ L'immunità cellulo-mediata, chiamata anche immunità cellulare, è mediata dai linfociti; può essere trasferita in individui vergini mediante cellule prelevate da un individuo immunizzato, ma non con siero

La specificità dell'immunità cellulo-mediata è dovuta ai linfociti, che spesso funzionano di concerto con altre cellule come i fagociti per controllare la crescita o determinare l'eliminazione dell'oggetto del riconoscimento



*Figura 11.6. Gli attori principali della storia degli studi sull'immunità cellulare: da sn. verso dx. Elie Metchnikoff, Almroth Wright, Merril Chase, George Mackaness*

*Da: organelas.com, jamd.com, lifeinlegacy.com, nature.com*

- *La teoria cellulare dell'immunità, che poneva le cellule dell'ospite come principale mediatore dell'immunità, fu sostenuta da Elie Metchnikoffl (1893) la sua dimostrazione di fagociti attorno ad una spina infilata in una larva translucente di stella marina è la prima dimostrazione di una risposta cellulare*
- *Ai primi del '900, Almroth Wright osservò che alcuni fattori presenti nel siero immune potenziavano la fagocitosi di batteri: opsonizzazione*
- *Nel 1942, Landsteiner e Merrill Chase dimostrarono che reazioni cutanee verso diversi composti chimici (un particolare tipo di sensibilizzazione) potevano essere ottenute in animali vergini mediante trasferimento di cellule, ma non di siero, da animali precedentemente immunizzati verso quegli antigeni*
- *La teoria cellulare dell'immunità si consolidò definitivamente negli anni '50, quando George Mackaness dimostrò che anche la resistenza ad un batterio intra-cellulare, la* Listeria monocytogenes, *poteva essere trasferita con cellule ma non con siero*

### 11.2.11. Valutazione clinica dello stato di immunità

☞ Lo stato di immunità viene saggiato valutando se un individuo potenzialmente esposto ad una certa sostanza mostra una risposta misurabile quando viene riesposto a (o saggiato con) quella data sostanza

Una reazione positiva (reazione misurabile) è indice di sensibilità al *test*, e gli individui che siano stati già esposti verso una data sostanza e ad essa rispondono con una reazione misurabile sono definiti sensibilizzati

Sono definiti ipersensibili ad un antigene quegli individui che rispondono in modo così violento da provocare un danno significativo con la risposta stessa

### 11.2.12. Cellule ed immunità

☞ L'immunità umorale e cellulare sono mediate dalla risposta di tipi diversi di linfociti che spesso funzionano di concerto con altre cellule come i fagociti per controllare la presenza o determinare l'eliminazione degli antigeni:

- i linfociti B rispondono agli antigeni differenziandosi in cellule producenti anticorpi
- i linfociti T sono i mediatori delle risposte cellulo-mediate ed i regolatori delle risposte immuni

### 11.2.13. Diverse funzioni di immunità umorale ed immunità cellulare

☞
- L'immunità umorale costituisce un meccanismo essenziale di difesa nei confronti dei microbi extra-cellulari e delle loro tossine accessibili agli anticorpi
- L'immunità cellulare costituisce la difesa contro i microrganismi intra-cellulari, come i virus ed alcuni batteri, che proliferano all'interno delle cellule dell'ospite, rendendosi inaccessibili agli anticorpi circolanti
- L'immunità cellulare induce e promuove la distruzione intra-cellulare dei microbi o la lisi delle cellule infettate, prima che in esse si producano nuovi agenti infettanti



## *11.3. I linfociti*

☞ La specificità delle risposte immuni è dovuta ai linfociti, che sono le uniche cellule dell'organismo in grado di riconoscere specificamente e discriminare determinanti antigenici diversi

E difatti recettori ad alta affinità specifici per l'antigene sono espressi esclusivamente dai linfociti

### 11.3.1. Sviluppo ed eterogeneità linfocitaria

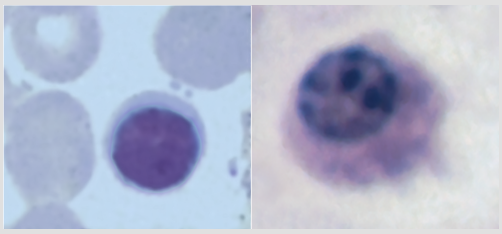


*Figura 11.7. A dx. un piccolo linfocita. Osservare la presenza di solamente una sottile rima citoplasmatica. A sn.: una plasmacellula. Osservare la cromatina a ruota di carro e la basofilia del citoplasma*

*Dalla collezione Eugenio Bonetti, Istituto di Patologia generale dell'Università di Bologna*

☞ I linfociti derivano dal midollo osseo come tutte le cellule ematiche

Il piccolo linfocita ha un diametro di 8-10 μm, con un grande nucleo mentre il citoplasma costituisce un sottile orlo. Non è quindi adatto ne alla fagocitosi ne alla produzione di grandi quantità di proteine (anticorpi)

☞ I linfociti si compongono di sotto-popolazioni distinte, molto diverse nelle loro funzioni e nei loro prodotti proteici, anche se appaiono tutti morfologicamente simili

☞ Oltre alla prima suddivisione in linfociti B e T la classificazione dei linfociti (e di tutti i leucociti) è fatta basandosi sulla presenza sulla superficie cellulare di antigeni chiamati *cluster of differentiation antigens* (CD)

Questa è una classificazione funzionale, perché a ciascun antigene CD è associata una molecola di superficie con specifiche proprietà e ruoli funzionali

### 11.3.2. Le molecole CD

*Tabella 1. Antigeni di superficie dei leucociti umani: la classificazione CD (*cluster differentiation*). Sono riportati alcuni esempi di molecole CD con le loro caratteristiche. L'elenco è parziale e solo a scopo esemplificativo: didattico. CDF: cellule dendritiche follicolari; NK cellule* natural killer*; LPS: lipopolisaccaride; PAMP:* pathogen-associated molecular pattern*, MHC:* major histocompatibility complex

| antigene | distribuzione | ligandi | funzioni prevalenti |
|---|---|---|---|
| CD1 | timociti, cellule dendritiche, enterociti | TCR dei linfociti Tγδ | presentano gli antigeni lipidici dei batteri intra-cellulari (*Mycobacterium leprae* e *M. tuberculosis*) ai linfociti Tγδ |
| CD2 | linfociti T e NK | | produzione di citochine, citolisi mediata da T o NK, apoptosi dei linfociti T |
| CD3 | linfociti T | | attivazione e funzione dei linfociti T |
| CD4 | linfociti T, cellule mieloidi | MHC-II, HIV | selezione ed attivazione dei linfociti T, recettore per HIV |
| CD8 | linfociti T | MHC-I | selezione ed attivazione dei linfociti T |
| CD14 (recettore per LPS) | macrofagi, granulociti | LPS | attivazione della risposta innata mediata da LPS ed altri PAMP |
| CD19 | linfociti B | | sviluppo, attivazione e differenziamento dei linfociti B |
| CD21 | linfociti B maturi | | sviluppo, attivazione e differenziamento dei linfociti B |
| CD23 | linfociti B, macrofagi, CDF | | sintesi di IgE, rilascio di citochine macrofagiche |
| CD40 | vari tipi cellulari, cellule neoplastiche | | attivazione, proliferazione e differenziamento dei linfociti B, blocco dell'apoptosi |
| CD45 | tutti i leucociti | | attivazione dei linfociti T e B, apoptosi |
| CD95 (Fas) | linfociti B e T attivati | ligando di Fas | media l'apoptosi |



## *11.4. Linfociti B*

☞ I linfociti B:

- sono così chiamati in quanto negli uccelli la maturazione avviene in un organo denominato borsa (da cui B) di Fabrizio
- nei mammiferi non esiste un equivalente anatomico della borsa, e le fasi precoci di maturazione delle cellule B si verificano nel midollo osseo; così la denominazione linfociti B si riferisce a linfociti maturati nella borsa o nel midollo osseo (*bone marrow*)
- i linfociti B (e le plasmacellule che da questi derivano) sono le uniche cellule capaci di produrre anticorpi
- il loro recettore per l'antigene è rappresentato da anticorpi fissati alla membrana cellulare
- l'interazione dell'antigene con questi anticorpi di superficie dà l'avvio alla sequenza di attivazione dei linfociti B che culmina nello sviluppo di cellule effettrici che secernono attivamente molecole di anticorpi (plasmacellule)
- rappresentano una popolazione eterogenea per specificità antigenica e stadio differenziativo e funzionale

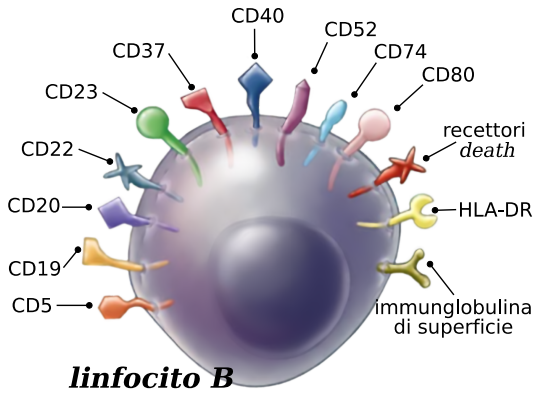



*Figura 11.8. Antigeni di superficie di un linfocita B*

*I linfociti B hanno un gran numero di antigeni associati alla membrana cellulare che sono legati alle varie funzioni ed ai vari stadi differenziativi*

*La presenza di questi antigeni consente una complessa classificazione dei linfociti B e dei tumori da essi derivati*

*Liberamente tratto da Cheson (2008)*

## 11.5. Linfociti T

☞ I precursori dei linfociti T originano dal midollo osseo, per poi migrare nel timo, dove vanno incontro a maturazione (la lettera "T" si riferisce appunto alla loro derivazione timica)

I linfociti T sono a loro i volta suddivisi in sotto-popolazioni funzionalmente distinte; tra esse:

- *linfociti T* helper*: inducono il superamento della tolleranza verso un antigene spostando la risposta da tolleranza a tentativo di eliminazione dell'antigene stesso*
- *linfociti T regolatori*: *inducono il mantenimento della tolleranza e sono normalmente dominanti sui linfociti* helper *ed hanno un ruolo determinante nel regolare l'ampiezza della risposta ed il suo spegnimento*
- *linfociti T citotossici (o citolitici)*

### 11.5.1. Linfociti T e MHC

☞ Le cellule T non producono anticorpi; il loro recettore per l'antigene è costituito da molecole di superficie diverse dagli anticorpi ma ad essi strutturalmente correlate

I linfociti T *helper* e citotossici riconoscono solo peptidi legati a proteine codificate dai geni del cosiddetto complesso maggiore di istocompatibilità (*major histocompatibility complex*, MHC), espresse sulla membrana di cellule accessorie

- l'MHC rappresenta la “targa” di ciascuna nostra cellula ed è praticamente univoca per ogni individuo



### 11.5.2. Meccanismo di uccisione da parte dei linfociti killer

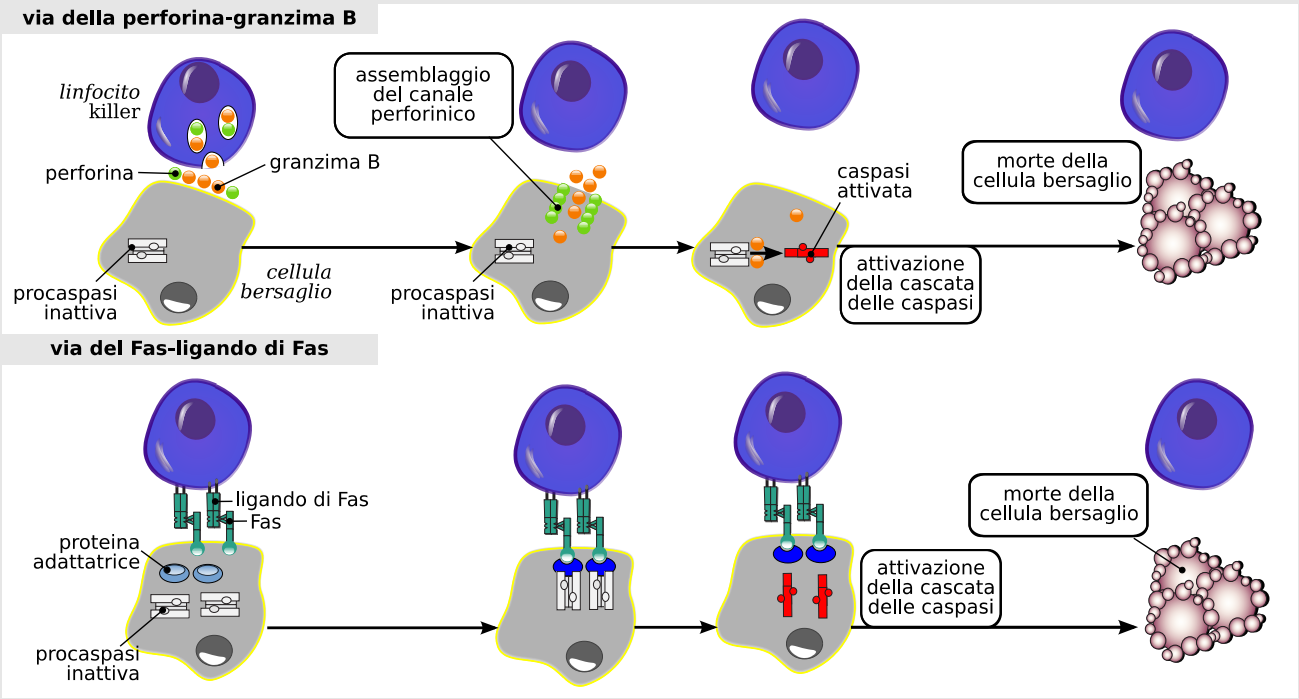



*Figura 11.9. Meccanismo di uccisione di una cellula bersaglio da parte dei linfociti T citotossici. Ci sono due vie attraverso le quali un linfocito può uccidere una cellula. In entrambi i casi vengono attivate le caspasi, provocando il suicidio cellulare per apoptosi*

## 11.5.3. Linfociti T *helper*: citochine, cellule attivate ed infezioni

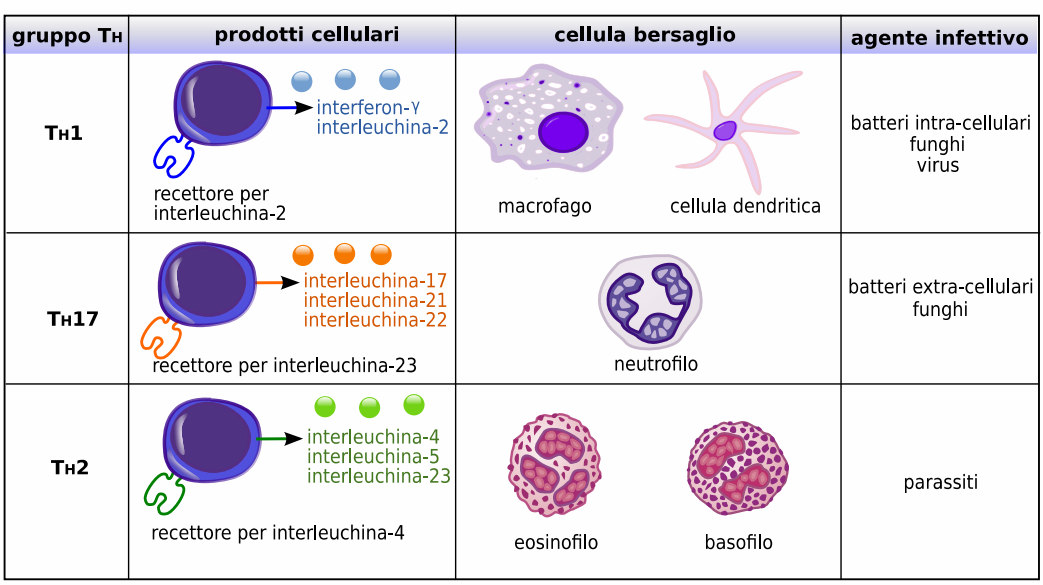



*Figura 11.10. Sottogruppi dei linfociti T* helper *e funzioni effettrici, il profilo citochinico (e dei relativi recettori), le cellule effettrici attivate, ed i corrispondenti tipi di infezione*

*Liberamente tratto da Miossec (2009)*

In risposta alla stimolazione antigenica, i linfociti T *helper* secernono citochine attivatorie

Queste citochine promuovono la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B e T stessi, nonché di altri tipi cellulari

Le citochine sono in grado di reclutare ed attivare i leucociti infiammatori costituendo un anello di congiunzione tra l'immunità specifica e l'immunità naturale



## 11.5.4. Linfociti T regolatori (Treg)

☞ I linfociti T regolatori ($T_{reg}$) $CD4^+$ e $CD8^+$ esprimono il recettore per IL-2 (CD25) e producono grandi quantità di IL-1

Costituiscono un gruppo importante di di cellule che controllano la risposta immunitaria

I linfociti $T_{reg}$ svolgono un'attività inibitoria nei confronti delle risposte immuni: la loro funzione è:

- essenziale nel mantenimento della tolleranza immunitaria a livello periferico
- normalmente prevalente sulla risposta *helper*
- nel blocco dell'amplificazione della risposta immune ad un dato antigene e nel suo spegnimento

☞ Dopo che la normale risposta immunitaria ad un microbo lo abbia eliminato, vengono attivati i linfociti $T_{reg}$ che sopprimono la risposta antimicrobica riducendo il danno per l'ospite che questa inevitabilmente produce

Alcuni microbi hanno sviluppato meccanismi per l'induzione della risposta $T_{reg}$ nel sito di infezione con l'effetto di promuovere l'infezione e la sopravvivenza del microbo stesso

- es.: nelle infezioni da *Leishmania* il parassita induce localmente nel sito di invasione cutanea l'accumulo di linfociti Treg che riduce la risposta immunitaria coltro il parassita e ne previene l'eliminazione

## 11.5.5. Linfociti T citotossici

☞ I linfociti T citotossici (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) sono capaci di lisare cellule che esprimono antigeni estranei od alterati quali-quantitativamente, quali le cellule infettate da virus o da altri microrganismi intra-cellulari

Questa forma di citotossicità è funzionale alla eliminazione di una singola cellula modificata prima che il danno si diffonda ulteriormente ad altre cellule, con evidente vantaggio evolutivo per i soggetti che hanno sviluppato questo sistema

### 11.5.6. Cellule accessorie dell'immunità innata: innesco dell'immunità adattativa

*Tabella 2. Cellule del sistema immunitario innato e loro ruolo nell'immunità naturale (innata non-adattativa) e adattativa. CD: cellule dendritiche; NK cellule* natural killer*; LPS: lipopolisaccaride; PAMP:* pathogen-associated molecular pattern*, MHC:* major histocompatibility complex*; IFN: interferone; APC:* antigen presenting cell

| cellule | ruolo nell'immunità innata | ruolo nell'immunità adattativa |
|---|---|---|
| macrofagi | fagocitosi e uccisione dei batteri; produzione di citochine pro-flogosi e di peptidi antibatterici | *Up-regulation* di molecole di adesione linfocitaria; chemiotassi per i linfociti; e attivazione della risposta T *helper* TH1 e della risposta B |
| CD plasmacitoiti | produzione di IFN-α (anti-tumorale ed anti-virale) | IFN-α è un potente attivatore di macrofagi e APC |
| CD mieloidi | produzione di IL-10 e IL-12 | attivazione di fagocitosi e di presentazione antigene |
| NK | uccisione di cellule estranee e proprie che abbiano perso le molecole MHC di classe I proprie | producono TNF-α e IFN-γ che innescano i T *helper* TH1 |
| cellule NK-T | linfociti che presentano sia i marcatori dei linfociti T che quelli delle cellule NK, riconoscono antigeni dei batteri intra-cellulari attraverso CD1 ed uccidono le cellule infette con batteri intra-cellulari | producono IL-4 per attivare i T *helper* TH2 e la risposta a IgE |
| neutrofili | fagocitosi e uccisione dei batteri; produzione di peptidi antibatterici | produzione di NO (che ha attività anti apoptotica sui linfociti) |
| eosinofili | uccisione di parassiti (pluricellulari) | produzione di IL-5 che attiva una risposta specifica |
| basofili e mastociti | rilascio di TNF-α, IL-6, IFN-γ in risposta a PAMPs | producono IL-4 per attivare i T *helper* TH2 e la risposta a IgE |
| cellule epiteliali | produzione di peptidi anti microbici; produzione di specifiche sostanze (es.: surfattanti polmonari) | producono TGF-β che innesca la risposta a IgA |



## *11.6. Le citochine: i messaggeri inter-cellulari*

### 11.6.1. Le principali interleuchine

*Tabella 3: Esempi di citochine leucocitarie (interleuchine) coinvolte nella dinamica immunitaria. L'elenco non è completo ed ha solo scopo esemplificativo-didattico. IL: interleuchina (citochina leucocitaria), NK cellule* natural killer*; linf.: linfocito; IFN: interferone; CTL:* cytotoxic T lymphocytes*; mφ: monociti/macrofagi*

| citochina | cellula produttrice | cellula bersaglio | attività biologica |
|---|---|---|---|
| IL-1 | mφ, linf. B, fibroblasti, cell. epiteliali ed endoteliali | tutti i tipi cellulari | *up-regulation* delle molecole di adesione; diapedesi di macrofagi e neutrofili, febbre, induzione delle proteine di fase acuta; favorisce l'emopoiesi |
| IL-2 | linf. T | linf. T e B, NK, mφ | attivazione e proliferazione di linf. T e B, NK |
| IL-4 | linf. T, basofili, mastociti | linf. T e B, NK, mφ, neutrofili, eosinofili, cell. endoteliali, fibroblasti | stimolano TH2 *helper* e la produzione di IgE |
| IL-5 | linf. T, mastociti, eosinofili | eosinofili, basofili | regola la migrazione e l'attivazione degli eosinofili |
| IL-6 | mφ, linf. B, fibroblasti, cell. epiteliali ed endoteliali | linf. T e B, cell. epiteliali, epatociti, mφ | induzione delle proteine di fase acuta; differenziamento e crescita dei linf. T e B e degli osteoclasti |
| IL-10 | mφ, linf. T e B, mastociti, cheratinociti | linf. T e B, NK, mφ, mastociti | inibizione della produzione di citochine pro-flogosi, inibizione di linf. T *helper* TH1 e di NK, stimolazione della proliferazione dei mastociti |
| IL-12 | mφ attivati, cellule dendritiche, neutrofili | linf. T, NK | induzione di linf. T *helper* , ed attivazione delle cellule killer attivate dalle linfochine, aumento dei linf $CD8^+$ CTL |
| IL-17 | linf. T $CD4^+$ | fibroblasti, cell. endoteliali ed epiteliali | aumentata secrezione di citochine |

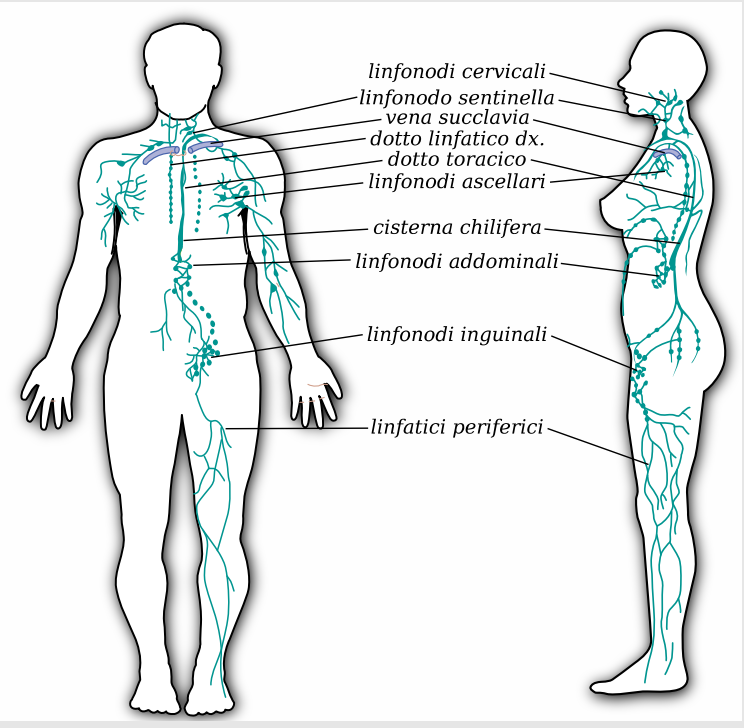
## Altre citochine

*Tabella 4: Esempi di citochine leucocitarie (interferoni, fattori di crescita etc.) coinvolte nella dinamica immunitaria. L'elenco non è completo ed ha solo scopo esemplificativo-didattico. NK cellule* natural killer*; linf.: linfocito; IFN: interferone; mφ: monociti/macrofagi; TNF:* tumour necrosis factor*; IL: interleuchina; TGF:* transforming growth factor*; MCP:* monocyte chemotactic protein*; G-, GM-, M-CSF:* granulocyte-, granulocyte-macrophage-, macrophage-colony stimulating factor*. MCP ed eotaxin sono chemiochine, citochine polipeptidiche a basso peso molecolare (<10,000) con forti somiglianze strutturali*

| citochina | cellula produttrice | cellula bersaglio | attività biologica |
|---|---|---|---|
| IFN-α e-β | tutte le cell. | tutte le cell. nucleate | anti-virale, stimola linf. T mφ e NK, effetti anti-tumorali diretti, up-regulation dell'espressione di MHC II |
| IFN-γ | linf. T, NK | tutte le cell. nucleate | regola attivazione di mφ e NK, etc. |
| TNF-α | mφ, basofili, eosinofili, linf. T e B, NK, cheratinociti, fibroblasti, epitelio timico | tutte le cell. nucleate | febbre, anoressia, shock, induzione/attivazione di proteine di fase acuta, NK, citochine pro-flogosi |
| TNF-β | linf. T e B | tutte le cell. nucleate | |
| G-CSF, GM-CSF, M-CSF | mφ, basofili, eosinofili, linf. T e B, NK, endotelio, fibroblasti, epitelio timico, cell. stromali | cell. mieloidi, mφ, endotelio, fibroblasti | *up-regulation* della mielopoiesi, aumento dell'attività NK, etc. |
| TGFβ | gran parte delle cell. | gran parte delle cell. | *down-regulation* di linf. T, mφ; stimola l'angiogenesi |
| MCP-1,-2, -3 | fibroblasti, cell. mononucleate del sangue periferico | mφ, basofili, eosinofili, linf. T, cell. dendritiche | chemiotassi e attivazione di eosinofili e basofili |
| MCP-4 | epitelio polmonare, intestinale, endotelio attivato | mφ, basofili, eosinofili | chemiotassi |
| eotaxin | Epitelio polmonare, cuore | eosinofili, basofili | chemiotassi per eosinofili e basofili, induce la risposta allergica immediata nelle vie aeree insieme a IL-5 |



# *11.7. Anatomia funzionale del sistema immunitario*



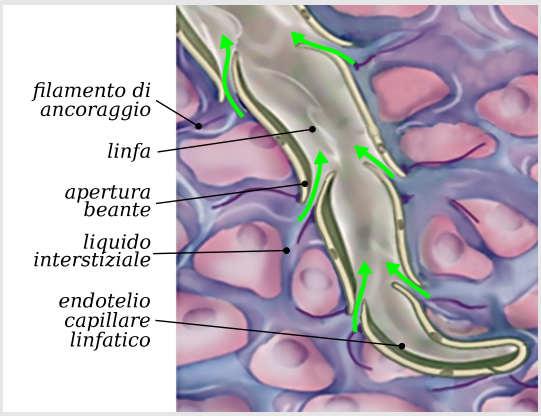




*Figura 11.11. Il sistema dei vasi linfatici*

*La disposizione dei vasi e delle strutture linfatiche presenta variazioni individuali molto pronunciate, con variazioni assai maggiori di quelle che si osservano nei vasi arteriosi e venosi*

*Il riquadro superiore liberamente tratto da: academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc*

### 11.7.1. Organi linfoidi primari e secondari

☞ I tessuti linfoidi possono essere classificati in due gruppi:

- *organi linfoidi primari, dove i linfociti si originano e maturano:*
  - midollo osseo, da cui originano tutti i linfociti
  - timo, in cui le cellule T maturano e raggiungono lo stato di competenza funzionale
- *organi linfoidi secondari (o periferici), dove i linfociti già maturi rispondono agli antigeni affini ai loro recettori*
  - linfonodi
  - milza
  - tessuto linfoide associato alle mucose (MALT, *mucosal associated lymphoid tissue*)
  - sistema immunitario cutaneo
  - aggregati di linfociti scarsamente definiti anatomicamente sono inoltre reperibili nei tessuti connettivi e praticamente in tutti gli organi, ad eccezione del sistema nervoso centrale

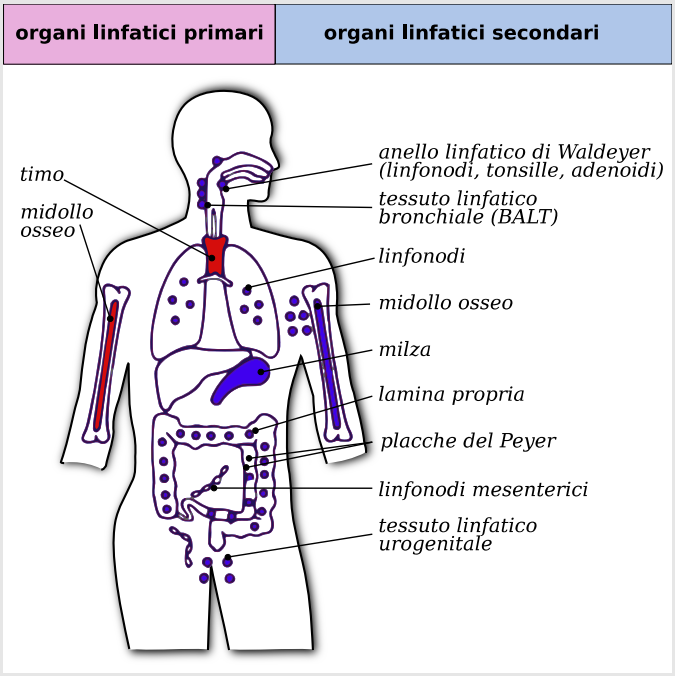



*Figura 11.12. Organi linfatici primari e secondari*
*Liberamente tratto da Roitt (1993)*



### 11.7.2. Immunità d'organo o di sistema

☞ Funzionalmente il sistema immunitario può essere inquadrato come un insieme unico (unici gli organi linfatici primari) formato tuttavia da un gruppo di sotto-insiemi capaci di operare indipendentemente e differentemente l'uno dall'altro:

- Il sistema immunitario sistemico (incentrato sul sangue): deve intervenire quando l'antigene ha superato le barriere verso l'esterno, cute e mucose; è in grado di raggiungere qualunque parte del corpo attraverso la circolazione, ed è in grado, nei processi flogistici, di raggiungere elevate concentrazioni locali
- il sistema immunitario intestinale (incentrato sulla sotto-mucosa intestinale), è quello quantitativamente maggiore. Deve affrontare una massa intestinale a composizione assai variabile e separata dall'interstizio solo per mezzo di una mucosa molto delicata, oltretutto specializzata nell'assorbimento delle sostanza nutritizie. É in grado di secernere anticorpi nel lume
- il sistema immunitario dell'albero respiratorio, che deve affrontare gli antigeni di piccole dimensioni trasportati dall'aria che in grandissimi volumi giornalieri vi transita. É in grado di secernere anticorpi nel lume
- il sistema immunitario cutaneo, che deve affrontare ogni tipo di antigeni provenienti dall'esterno, è tuttavia protetto dall'epitelio cutaneo, assai più resistente e selettivo delle mucose

#### Il sistema immunitario alle superfici mucose (*mucosal associated lymphoid tissue*, MALT)

☞ La mucosa che ricopre i tratti respiratorio, digestivo ed urogenitale, l'orecchio interno e ed i dotti di tutte le ghiandole esocrine contiene cellule dei sistemi immunitari innato ed adattativo per la protezione contro i microbi patogeni

Nel giovane adulto, il sistema MALT (*mucosal associated lymphoid tissue*) contiene l'80% di tutte le cellule immunitarie costituendo nel suo insieme l'organo linfatico più grande dell'organismo

## 11.7.3. Ricircolo linfocitario

☞ La maggioranza dei linfociti, dei fagociti mononucleati (distinti tradizionalmente dai polimorfonucleati, che tuttavia sono ad un unico nucleo anch'essi) e delle altre cellule accessorie è localizzata in organi e tessuti anatomicamente definiti dove gli antigeni che sono entrati nell'interstizio vengono trasportati e concentrati

Il risultato è l'ottimizzazione delle interazioni cellulari necessarie per le fasi di riconoscimento e di attivazione delle risposte immuni specifiche

☞ Perché il sistema immunitario funzioni è quindi indispensabile la mobilità dei suoi componenti

La maggior parte dei linfociti ricircola, scambiando localizzazione continuamente tra il torrente circolatorio e i diversi tessuti

- la variabilità di specificità è altissima (valutata sino a $10^{11}$ strutture differenti), mentre ciascun linfocita ne esprime solo una
- per ottenere che i linfociti più affini incontrino l'antigene là dove viene presentato, è quindi necessario che i linfociti stessi ricircolino rapidamente, creando l'occasione di incontro con una sufficiente probabilità in un tempo utile (nei fatti la risposta immunitaria primaria, ad esempio, impiega dai 5 ai sette giorni per manifestarsi, e parte di questo tempo è necessario affinché i linfociti più affini finiscano per incontrare l'antigene)



### Ricircolo tra sangue, linfa, e milza

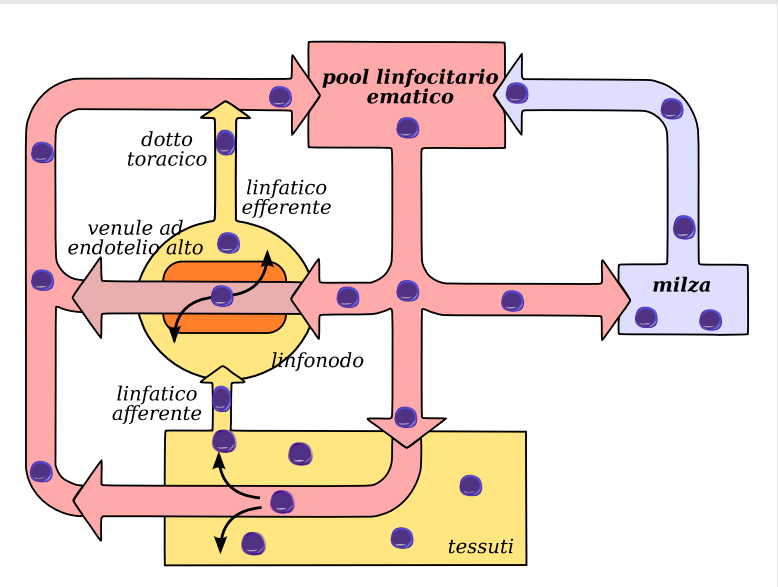



*Figura 11.13. Circolazione dei linfociti*
*Liberamente tratto da Roitt (1993)*

In un individuo adulto e maturo

- i linfociti circolano attraverso i vasi sanguigni ed entrano nei tessuti e nei linfonodi attraverso le cellule endoteliali specializzate delle venule ad endotelio alto (*high endothelium venules*, HEV)
- poi lasciano i linfonodi attraverso i linfatici efferenti e passano attraverso altri linfonodi, poi nel dotto toracico che si getta nella vena succlavia sinistra
- milza. I linfociti entrano nella polpa bianca attraverso la zona marginale, poi passano nei sinusoidi della polpa rossa e lasciano la milza attraverso la vena splenica

### 11.7.4. Midollo Osseo

☞ Il midollo osseo è la sede del compartimento germinativo delle cellule del sistema immunitario

- durante la vita fetale, la produzione di tutte le cellule ematiche, incluse le cellule linfatiche, chiamata ematopoiesi, o emopoiesi, avviene inizialmente nel sacco vitellino, e successivamente nel fegato e nella milza
- la funzione emopoietica (e linfopoietica) è gradualmente assunta dal midollo osseo, ed in particolare dal midollo delle ossa piatte, cosicché alla pubertà l'emopoiesi (e la linfopoiesi) si realizza soprattutto nello sterno, nelle vertebre, nelle ali iliache e nelle costole

### 11.7.5. Tessuto midollare differenziato

☞ Il midollo osseo contiene anche tessuto linfatico maturo funzionale o parzialmente differenziato:

- linfociti B maturi, sviluppatisi dalle cellule progenitrici
- plasmacellule anticorpo-secernenti, che si sviluppano nei tessuti linfoidi periferici a seguito della stimolazione antigenica dei linfociti B che poi migrano nel midollo
- linfociti T *uncommitted* si formano nel midollo osseo prima della loro maturazione e selezione finale nel timo



### 11.7.6. Il Timo

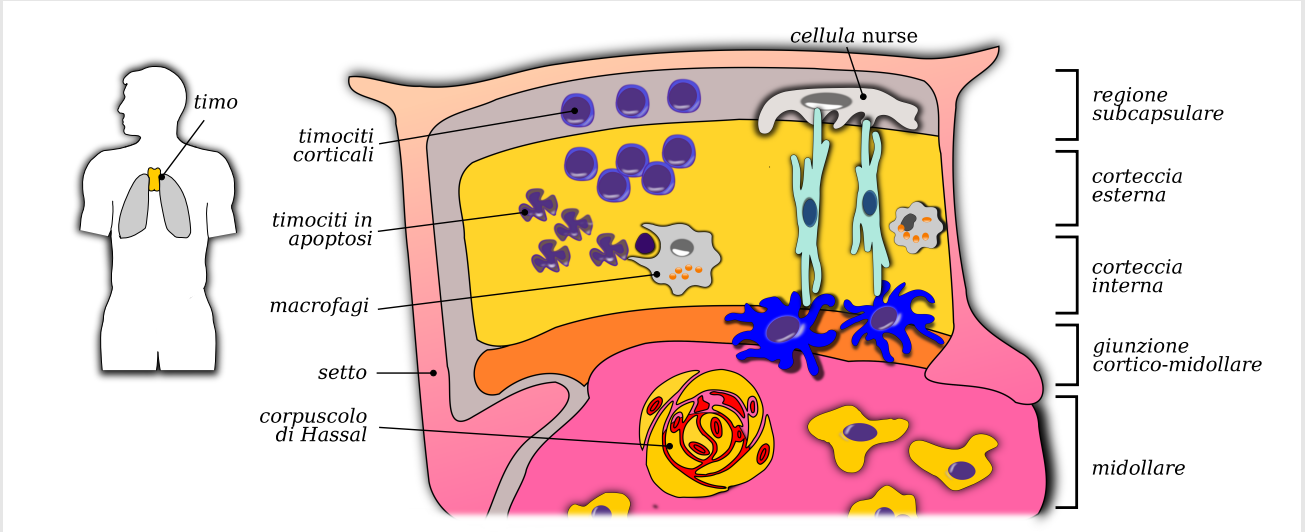



*Figura 11.14. Struttura del timo. Liberamente tratto da Roitt (1993)*

*Il timo è un organo bilobato situato nel mediastino anteriore. Ogni lobo è suddiviso da setti fibrosi in lobuli, formati da una zona corticale esterna ed una zona midollare interna. La zona corticale è composta da un agglomerato di linfociti T. La zona midollare è meno popolata da linfociti. Disseminate in tutto il tessuto timico si trovano cellule non linfoidi di tipo epiteliale, con abbondante citoplasma, e cellule dendritiche e macrofagi derivati dal midollo osseo*

*Nella zona midollare sono osservabili particolari strutture denominate corpuscoli di Hassal, formate da spirali di cellule epiteliali strettamente impacchettate, che rappresentano residui di cellule in degenerazione. Il timo possiede una ricca rete vascolare e vasi linfatici efferenti che si scaricano nei linfonodi mediastinici*

## 11.7.7. Timociti

☞ I linfociti timici, chiamati timociti, sono linfociti T in vario stadio di maturazione:

- i precursori destinati a differenziarsi lungo la linea linfocitaria T entrano nel timo, provenienti dal midollo osseo, tramite il circolo
- le cellule immature migrano dalla zona corticale verso la midollare timica, venendo in contatto con cellule epiteliali, macrofagi e cellule dendritiche
- una interazione efficiente avviene nei complessi linfo-epiteliali, in cui i linfociti si trovano in intimo contatto con le invaginazioni della membrana plasmatica delle cellule epiteliali, chiamate per questo motivo appunto cellule nutrici
- sulla via che li porterà alla zona midollare, i timociti cominciano ad esprimere i recettori per l'antigene ed i marcatori di superficie tipici dei linfociti T maturi periferici
- la zona midollare contiene quindi prevalentemente linfociti T maturi; soltanto linfociti T maturi $CD4^+$ o $CD8^+$ possono uscire dal timo ed entrare nel torrente circolatorio, nella linfa e nei tessuti linfoidi periferici

☞ Del gran numero di linfociti T immaturi che entrano nel timo, molti linfociti troppo reattivi con gli antigeni autologhi vengono mandati in apoptosi, mentre tutti gli altri linfociti che rispondono con tolleranza agli antigeni autologhi vengono stimolati a maturare

Questi processi di selezione sono indispensabili perché il sistema immunitario possa mantenere lo stato di tolleranza verso il *self*



## 11.7.8. Linfonodi

☞ I linfonodi sono piccoli aggregati nodulari di tessuto linfoide situati lungo i vasi linfatici in tutto il corpo

La maggior parte delle strutture anatomiche possiede vasi linfatici attraverso cui defluisce il liquido interstiziale proveniente dai capillari, assicurando così un continuo “lavaggio” di tutto l'interstizio. Tutto ciò che raggiunge l'interstizio, quindi, finisce nei vasi linfatici e viene trasportato ai linfonodi dove viene confrontato con il sistema immunitario

In questo modo, il sistema linfatico garantisce un meccanismo per raccogliere gli antigeni, e le cellule presenti nei linfonodi semplicemente “ispezionano” la linfa per la presenza di materiale antigenico

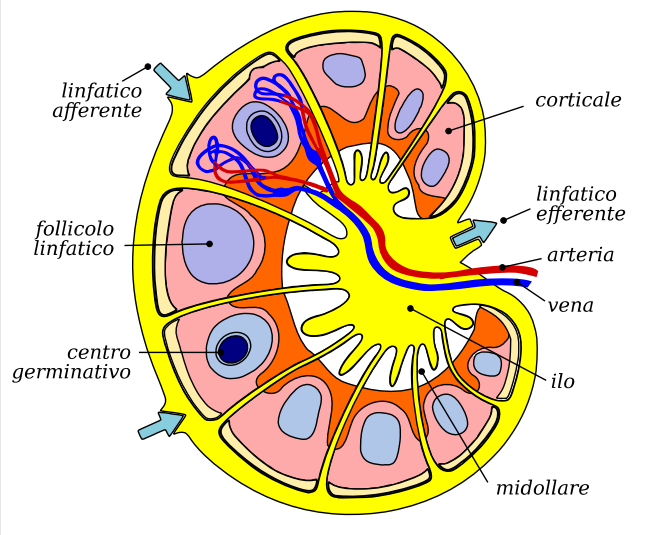
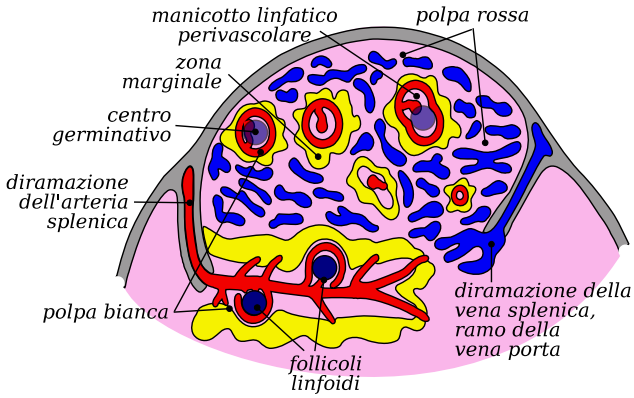



*Figura 11.15. Struttura di un linfonodo. Liberamente tratto da Roitt (1993)*

- *Ogni linfonodo è delimitato da una capsula fibrosa perforata da numerosi linfatici afferenti, che svuotano la linfa nel seno sotto-capsulare*
- *Il linfonodo consiste di una zona corticale esterna in cui si ritrovano aggregati di cellule che costituiscono i follicoli, alcuni dei quali contengono un'area centrale detta centro germinativo, e una regione esterna detta zona mantellare*
- *I follicoli privi di centro germinativo vengono definiti follicoli primari, mentre quelli dotati di centro germinativo prendono il nome di follicoli secondari*
- *La zona midollare interna contiene una popolazione meno densa di linfociti e fagociti mononucleati disseminata tra i sinusoidi linfatici e vascolari*
- *La linfa che entra nel seno sotto-capsulare filtra attraverso la zona corticale e midollare, ed esce dal linfonodo attraverso un vaso linfatico efferente in corrispondenza dell'ilo linfonodale*

## 11.7.9. Milza




- *La milza è un organo del peso di circa 150 g nell'adulto, localizzato nel quadrante superiore sinistro dell'addome*
- *Le arteriole spleniche (rami dell'arteria splenica) sono avvolte da manicotti di linfociti, denominati manicotti linfoidi peri-arteriolari, a cui sono collegati i follicoli linfoidi, alcuni dei quali contengono un centro germinativo*
- *I gusci linfoidi peri-arteriolari e i follicoli sono circondati da un sottile orlo, costituito da linfociti e macrofagi e denominato zona marginale*
- *L'insieme del tessuto linfatico costituisce la polpa bianca della milza*
- *Le arteriole si riversano in sinusoidi vascolari, tra i quali è disseminato un gran numero di macrofagi, cellule dendritiche, rari linfociti e plasmacellule; questa costituisce la polpa rossa*
- *I sinusoidi sboccano in venule drenanti nella vena splenica, che trasporta il sangue alla circolazione portale*

*Figura 11.16. Milza: struttura. Liberamente tratto da Roitt (1993)*

☞ La funzione della milza e la sua risposta agli antigeni sono molto simili a quelle dei linfonodi

- *Differenza essenziale: la milza è il sito principale delle risposte immuni verso antigeni presenti nel torrente circolatorio, mentre i linfonodi sono coinvolti nella risposta ad antigeni che si ritrovano nella linfa*

La milza rappresenta anche un importante "filtro" per il sangue: i macrofagi della polpa rossa sono infatti responsabili della rimozione di globuli rossi invecchiati e di svariati complessi macromolecolari e proteine

La milza non è un organo indispensabile. Le sue funzioni possono venire vicariate dagli altri organi linfatici secondari (che in assenza della milza divengono ipertrofici) e dal sistema reticolo-endoteliale presente in altri organi (fegato e midollo osseo) per quanto riguarda l'emocateresi, anche se, a seguito di spenectomia, permane una maggior suscettibilità alla infezioni



## 11.7.10. Altri tessuti linfoidi periferici

☞ Linfociti si ritrovano, disseminati o riuniti a costituire aggregati, in molti tessuti dell'organismo

Alcuni di questi agglomerati sono anatomicamente ben organizzati, e mostrano caratteristiche del tutto particolari

Al di sotto della mucosa del tratto gastro-intestinale e respiratorio sono localizzati aggregati di linfociti e di cellule a funzione accessoria, che richiamano strutturalmente e funzionalmente i linfonodi

Tra questi aggregati si annoverano:

- le placche di Peyer nella lamina propria dell'intestino tenue
- le tonsille faringee
- i follicoli linfoidi sottomucosi dell'appendice e delle vie aeree superiori
- il sistema immune associato alla cute è composto di linfociti e cellule accessorie presenti a livello dell'epidermide e del derma

☞ Tessuti linfoidi ectopici possono organizzarsi a livello delle sedi di intensa risposta immunologica

- Es.: l'artrite reumatoide, in cui la risposta immune che si sviluppa a livello sinoviale porta alla distruzione dei capi articolari; in molti casi, i tessuti sinoviali contengono follicoli linfatici ben sviluppati, con centri germinativi molto evidenti

## 11.8. Principali fonti utilizzate

*Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2011). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. III ed. Elsevier, Philadelphia*

*Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2009) Cellular and molecular immunology. VI ed. Elsevier Saunders, Philadelphia*

*Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2000). Cellular and molecular immunology. IV ed. W.B. Saunders, Philadelphia*

*Cheson, B.D., Leonard, J.P. (2008) Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. N. Engl. J. Med. 359, 613-626*

*Haynes, B.F.., Soderberg, K.A., Fauci, A.S. (2008) Introduction to the immune system. In: Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (eds.) Harrison's principles of internal medicine. XVII ed. Mc Graw Hill, New York. Pp. 2019-2045*

*Janeway, C.A., Travers, O. (1994) Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland, New York*

*Lakhani, S.R., Dilly, S.A., Finlayson, C.J., Dogan, A. (2003) Basic pathology. An introduction to the mechanisms of disease. III ed. Arnold, London*

*Mossiec, P., Korn, T., Kuchroo, V.K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. New. Engl. J. Med. 361, 888-898*

*Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M. (2008) Janeway's immunobiology. VII ed. Garland Sience, New York*

*National Library of Medicine, Bethesda, Maryland*

*Roitt, I. M., Brostoff, J., Male, D. K. (1993) Immunology. III ed. Mosby, Edinburgh*

*Rubin, R., Farber, J.L. (1988) Pathology. I ed. Lippincott, Philadelphia*

### Siti web

| | | |
|---|---|---|
| *academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc* | *visitato il 18/06/2008* | *contenuto non più disponibile il 21/06/2011* |
| *kajipon.sakura.ne.jp* | *visitato il 30/07/2008* | *contenuto non più disponibile il 29/06/2012* |
| *med.umich.edu* | *visitato il 28/10/2009* | *accessibile il 17/06/2013* |
| *nndb.com/people* | *visitato il 01/07/2007* | *contenuto non più disponibile il 22/06/2011* |
| *nobelprize.org* | *visitato il 30/07/2008* | *accessibile il 17/06/2013* |
| *usuarios.cultura.com.br* | *visitato il 30-07-2008* | *contenuto non più disponibile il 22/06/2011* |
| *wikia.nocookie.net/_/Senator.jpg* | *visitato il 11/06/2013* | *accessibile il 11/06/2013* |









