



Istituto di Scienze dell'Alimentazione



con il patrocinio della
Provincia di Avellino

Workshop Alimentazione ed Immunità: *Interazioni del GALT con microflora ed alimenti*

Avellino 21-22 novembre 2003

BIO-RAD

TEMA ricerca

pb international
D.B.A. Italia s.r.l.

BD Biosciences
Mucedola s.r.l.

GakoCytomation

ve-ri-co

Lattobacilli ed interazioni con il GALT: ceppo-specificità ed ipotesi di meccanismi

Lorenzo Morelli

Istituto di Microbiologia-Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84- 29100 Piacenza
morelli@pc.unicatt.it

La microflora dell'intestino è un sistema complesso, formato da una pluralità di nicchie ecologiche che ospitano una popolazione batterica formata da oltre 400 specie e da un innumerevole quantità di ceppi. Questo ecosistema svolge funzioni di estrema rilevanza per il mantenimento dello stato di salute dell'uomo; ad esempio la dose infettiva di numerosi batteri patogeni è molto ridotta in presenza di una flora intestinale depauperata. Come in tutti gli ecosistemi vi è una pluralità di interazioni fra il contenuto (i batteri) e il contenitore (gli epitelii intestinali). Risulta pertanto rilevante poter comprendere i meccanismi che presiedono alle complesse interazioni fra queste due componenti dell'ecosistema intestinale, in particolare con il tessuto linfoide associate alle mucose intestinali, il GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). Diversi articoli sono stati recentemente pubblicati su questo tema, prevalentemente dal punto di vista immunologico, mentre poco è noto sulle componenti batteriche più coinvolte nel "dialogo" con il GALT.

Recenti lavori hanno dimostrato, con evidenze di tipo clinico, la possibilità di ottenere una modulazione del profilo immunologico di soggetti alimentati con probiotici; restano però poco noti i meccanismi molecolari che presiedono a questo tipo di attività modulante.

Un primo punto di partenza è l'interazione con le strutture deputate al primo riconoscimento e processamento degli antigeni batterici, le placche del Peyer.

E' stato possibile dimostrare come l'adesione a queste strutture siano ceppo-specifica (come del resto tutte le attività probiotiche fino ad ora studiate) e indipendenti dai meccanismi di adesione ai tessuti intestinali non-linfoidi (1,2). Questi dati, uniti a quelli che dimostrano come ceppi diversi di lattobacilli inducono livelli diversi di produzione delle varie citochine (3,4,5,) fanno pensare alla necessità di un processo di selezione specifico che tenga in considerazione il profilo immuno-modulante (6,7,8) del ceppo in esame; in particolare si dovranno selezionare ceppi capaci di non indurre risposte pro-infiammatorie.

Un filone di ricerca seguito nell'Istituto di Microbiologia UCSC prevede l'uso di ceppi probiotici e di loro mutanti, al fine di utilizzare questi modelli sperimentali per una migliore comprensione delle strutture molecolari batteriche coinvolte. In particolare è stato utilizzato il ceppo *L.crispatus* M247 e un suo mutante denominato Mu5. Di questi ceppi si è dimostrata una diversità capacità di colonizzazione dell'uomo (9). Inoltre, in modelli animali di colite indotta da DSS è stato possibile evidenziare la capacità di protezione dalla patologia (10) e contemporaneamente si è dimostrato come solo il ceppo wild type riducesse in misura significativa il rilascio di IL-8 da cellule epiteliali (HT-29).

Bibliografia.

1. Plant L, Conway P. Association of *Lactobacillus* spp. with Peyer's Patches in Mice. Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Mar; 8(2): 320-324.
2. Ibnou-Zekri N, Blum S, Schiffrin EJ, von der Weid T. Divergent Patterns of Colonization and Immune Response Elicited from Two Intestinal *Lactobacillus* Strains That Display Similar Properties *in vitro*. Infect Immun. 2003 Jan; 71(1): 428-436.
3. Kimura K, McCartney AL, McConnell MA, Tannock GW. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. Appl Environ Microbiol. 1997 Sep; 63(9): 3394-3398.
4. Perdigon G, Maldonado Galdeano C, Valdez JC, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. Eur J Clin Nutr. 2002 Dec; 56 Suppl 4: S21-6.
5. de Waard R, Claassen E, Bokken GC, Buiting B, Garssen J, Vos JG. Enhanced Immunological Memory Responses to *Listeria monocytogenes* in Rodents, as Measured by Delayed-Type Hypersensitivity (DTH), Adoptive Transfer of DTH, and Protective Immunity, following *Lactobacillus casei* Shirota Ingestion. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan; 10(1): 59-65.
6. Haller D, Blum S, Bode C, Hammes WP, Schiffrin EJ. Activation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by Nonpathogenic Bacteria In Vitro: Evidence of NK Cells as Primary Targets. Infect Immun. 2000 Feb; 68(2): 752-759.
7. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, Julkunen I. Lactobacilli and Streptococci Induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and Gamma Interferon Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Infect Immun. 1998 Dec; 66(12): 6058-6062.
8. Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y. Lipoteichoic Acids from *Lactobacillus* Strains Elicit Strong Tumor Necrosis Factor Alpha-Inducing Activities in Macrophages through Toll-Like Receptor 2. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Mar; 10(2): 259-266.
9. Cesena C, Morelli L, Alander M, Siljander T, Tuomola E, Salminen S, Mattila-Sandholm T, Vilpponen-Salmela T, von Wright A (2001) *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. J Dairy Sci 2001 **84**, 1001-10.
10. Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, Elli M, Tormen D, Brun P, Sturniolo G.C, Morelli L, Palù G. The protective effect of *Lactobacillus crispatus* during DSS colitis is related to its aggregating phenotype. 2003 in stampa.

Probiotici e risposte immuni ad antigeni alimentari

Roberto Paganelli

Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento e Centro Studi sull'Invecchiamento, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

Con il termine di allergia alimentare si intendono le reazioni avverse all'ingestione di cibi sostenute da meccanismi immunologici, siano essi di tipo IgE (anafilassi) che di altro tipo (di tipo T cellulare, come nel caso del morbo celiaco, o più raramente di tipo IgG4, dimostrato solo in casi sporadici). Infatti, come indicato nel Position paper dell'EAACI (Adverse reactions to food, Allergy 50:623-635, 1995) le reazioni indesiderate ai cibi possono essere distinte in forme tossiche (quando tutti o la maggioranza di quelli che li consumano presentano i sintomi) e forme non tossiche, quando solo una minoranza dei consumatori accusa dei sintomi. Sono queste ultime forme che possono avere le caratteristiche di allergia o intolleranza. Tra le intolleranze (reazioni non immuno-mediate) possiamo distinguere quelle dovute a disfunzioni enzimatiche (deficit di disaccaridasi, ma anche di enzimi diversi per la digestione di altri zuccheri, di aminoacidi o di lipidi - vi rientrano anche le forme che trovano in un'alterazione della flora batterica intestinale capace di scindere macromolecole complesse la loro causa principale), quelle causate da proprietà farmacologiche intrinseche agli alimenti e quelle dovute a contaminanti, rappresentati principalmente da additivi chimici. In questo ultimo caso i meccanismi patogenetici sono largamente sconosciuti, e la prevalenza non supera lo 0,1%. Alcuni casi di asma, equivalenti asmatici o shock anafilattico sono riportati soprattutto per tartrazina, solfiti e glutammato monosodico.

Nella nostra esperienza, principalmente dovuta a casi di orticaria cronica embricata con sintomi gastrointestinali e/o articolari, il principale metodo diagnostico di screening è costituito da una dieta di eliminazione oligoallergenica protratta per almeno 10-15 giorni. Solo una scomparsa dei sintomi, o una loro riduzione oltre il 50% nei casi più gravi, giustifica un approfondimento diagnostico nel senso di una possibile eziologia alimentare. La successiva reintroduzione può costituire una utile aggiunta per circoscrivere il tipo di cibi incriminati. Le tappe successive sono rappresentate dalla ricerca di IgE specifiche sia in vivo (prick e prick-by-prick test) che in vitro, eventualmente di IgG specifiche, di mediatori (ECP, triptasi), di alterazioni immunitarie (VES, PCR, complemento, leucociti, eosinofili, autoanticorpi), e di allergie da contatto, principalmente da Nickel (mediante patch test). Sia in casi di anafilassi post-prandiale da esercizio fisico che in casi di diarrea cronica non infettiva, è frequente trovare multiple positività anche IgE per diversi alimenti. Il ruolo dei probiotici quale utile aggiunta nella profilassi e nel trattamento di patologie immunomEDIATE infettive o meno con coinvolgimento del tratto gastroenterico rappresenta un nuovo utile approccio proposto. In effetti l'integrità della mucosa intestinale, la microflora residente ed il sistema immune locale rappresentano tre entità in continuo confronto che necessitano di questo per il loro sviluppo e mantenimento omeostatico. Una rottura dell'equilibrio può causare risposte immuni abnormi con infezioni o danni infiammatori. Numerosi studi hanno dimostrato l'utilità della supplementazione dietetica con probiotici in patologie gastroenteriche infettive e infiammatorie. L'uso nei volontari sani, nell'anziano e nell'infanzia ha messo in luce le proprietà immunostimolanti ed immunoricostruenti dei probiotici, in particolare sullo sviluppo dei B linfociti IgA+, della attività fagocitica e citotossica, e della sintesi di citochine. Ancora non vi è completa certezza sull'assoluta mancanza di rischi dovuta alla somministrazione di probiotici in soggetti immunocompromessi. Nonostante la possibile prevenzione di un orientamento dell'assetto citochinico in senso pro-infiammatorio (tipo 1) o pro-allergico (Tipo 2), la loro utilità nella prevenzione e nella terapia delle allergie alimentari, in associazione con altre strategie, non è ancora validata.

Bibliografia essenziale:

- Kirjavainen PV et al. 1999. New aspects of probiotics – a novel approach in the management of food allergy. Allergy 14:909-915.
- Dugas B et al. 1999. Immunity and probiotics. Immunol. Today 20:387-390.
- Gill HS et al. 2001. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly : an investigation of age-related immunological changes. J Clin Immunol 21: 264-271.
- Paganelli R et al. 2002. Probiotics and food-allergic diseases. Allergy 57: 97-99.
- Calder PC, Kew S 2002. The immune system: a target for functional foods? Br J Nutr 88: 165-177.
- Borriello SP et al. 2003. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clin Infect Dis 36: 775-780.
- Fiocchi A et al. 2003. Primary dietary prevention of food allergy. Ann Allergy Asthma Immunol 91: 3-12.

Applicazioni biotecnologiche della spora batterica: da probiotico a vettore di vaccinazione mucosale

Ezio Ricca

Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università Federico II, via Mezzocannone 16 80134 Napoli
ericca@unina.it

Bacillus subtilis è un batterio Gram positivo sporigeno, cioè in grado di differenziare una endospora in risposta a condizioni di stress ambientale. A causa di tale peculiarità *B. subtilis* fin dagli anni '70 è stato estensivamente utilizzato come sistema modello procariotico per studiare l'espressione genica ed il differenziamento microbico. Una volta rilasciata la spora matura risulta estremamente resistente a estremi di temperatura, all'essiccamento, all'esposizione ai raggi UV e ad agenti chimici tossici. Tali caratteristiche fanno della spora un attraente strumento biotecnologico che trova applicazione in svariati settori, dalle nanotecnologie alle biotecnologie industriali. Le spore di *B. subtilis* sono, inoltre, non patogene e tale caratteristica addizionale è alla base del loro consolidato, sebbene empirico, utilizzo come probiotici e, più recentemente, come vettori per veicolare antigeni eterologhi alle superfici mucosali. Essendo la mucosa il sito d'ingresso di numerosi microrganismi patogeni, la capacità di indurre una risposta immunitaria locale è un importante obiettivo nella messa a punto di nuovi vaccini orali. In tale contesto, è stato recentemente sviluppato un sistema genetico per la presentazione di antigeni eterologhi sulla superficie di spore di *Bacillus subtilis* (1). Tale sistema è stato utilizzato per la presentazione di due antigeni modello, sostanzialmente diversi tra loro per dimensione ed immunogenicità: il frammento C della tossina tetanica (TTFC) (1, 2) e la subunità B dell'enterotossina termolabile di *E. coli* (LTB) (3).

Entrambi gli antigeni quando esposti sulla superficie sporale inducono una risposta immune specifica in topi immunizzati con le spore ricombinanti, indicando l'uso delle spore come un promettente approccio per lo sviluppo di nuovi vaccini mucosali.

1. Istatico, R., Cangiano, G., Tran, T.-H., Ciabattini, A., Medaglini, D., Oggioni, M.R., De Felice, M., Pozzi, G. and E. Ricca. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. J. Bacteriol. **183**:6294-6301 (2001).
2. Duc, L.H., Huynh, H.A., Fairweather, N., Ricca E. and S.M. Cutting. Bacterial Spores as Vaccine Vehicles. Infect.&Immun. **71**:2810-2818 (2003).
3. Mauriello, E., Le, D. H., Istatico, R., Cangiano, G., Hong, H. A., De Felice, M., Ricca, E. and S. M. Cutting. Display of Heterologous Antigens on the *Bacillus subtilis* Spore Coat Using CotC as a Fusion Partner. Vaccine *in press*. (2003).

Probiotici: Effetti immunomodulatori del DNA probiotico sul sistema immunitario dell'ospite.

Karen Lammers, Patrizia Brigidi, Ailsa Hart, Paolo Gionchetti, Beatrice Vitali, Fernando Rizzello, Stella Knight, Michael Kamm, Andy Stagg, Massimo Campieri
Università de Bologna, Bologna, Italia; St. Mark's Hospital and Imperial College, London, Inghilterra

Introduzione

Fra i batteri presenti comunemente nel tratto gastrointestinale vi sono i generi *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Viste le loro proprietà benefiche per la salute dell'ospite, i ceppi di *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* sono i più frequentemente utilizzati nelle preparazioni probiotiche commerciali. Il VSL#3 è una preparazione contenente altissime concentrazioni di ceppi probiotici liofilizzati (3 di bifidobatteri, 4 di lattobacilli ed uno di *Streptococcus thermophilus*), che è stata testata con efficacia in studi clinici controllati contro placebo nella terapia di mantenimento nella colite ulcerosa, della profilassi della pouchite e nella prevenzione della recidiva post-chirurgica della malattia di Crohn. 'CpG motifs', sequenze non-metilate del DNA soprattutto espresse nei batteri hanno la capacità di attivare la risposta immunitaria. 'CpG motifs' sono riconosciuti dal sistema immunitario tramite il recettore Toll-like 9 (TLR9), un recettore specifico per i CpG motifs ma anche in grado di riconoscere i virus. In particolare, le cellule dendritiche plasmocitoidi esprimono il TLR9 e sono in grado di rispondere allo stimolo con la produzione di alti livelli di interferone- α (IFN α).

Il nostro obiettivo è stato quello di studiare gli effetti dei ceppi probiotici del VSL#3 sulle PBMC e le cellule dendritiche. Obiettivo primario in questo studio è stato quello di determinare l'effetto immunomodulatorio sulla risposta immunitaria da parte del DNA dei batteri probiotici e di valutare l'eventuale ruolo chiave delle cellule dendritiche.

Metodi e Materiali

E' stato estratto il DNA genomico delle colture pure dei ceppi probiotici contenuti nel VSL#3 (*B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum* e *S. thermophilus*) è stato estratto. E' stato purificato il DNA totale delle feci di 2 donatori sani, prima (T0) e dopo due settimane di somministrazione del VSL#3 (6 g di batteri/die) (T1). La concentrazione e la purezza delle preparazioni del DNA sono state determinate mediante la misura della assorbanza OD₂₆₀ e la ratio OD_{260/280}, rispettivamente. Per escludere contaminazione con LPS, le preparazioni sono state controllate con il *Limulus* amebocyte assay. Alle colture delle PBMC e delle cellule dendritiche del sangue (la coltura del sangue intero e la coltura delle cellule dendritiche 'arricchite' mediante un gradiente di metrizamide) sono state aggiunte le preparazioni del DNA; in alcune colture del sangue intero, è stato aggiunto monensin per la valutazione della produzione intracellulare delle citochine. Alla fine delle colture, i sovrantananti e i sieri sono stati raccolti per la valutazione della produzione delle citochine IL-10, IL-1 β o IFN α usando la tecnica ELISA. La produzione intracellulare delle citochine da parte delle cellule dendritiche è stata analizzata tramite flowcytometry. Le cellule dendritiche sono state individuate come popolazioni lin⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD34⁻, CD56⁻) HLA-DR⁺; CD11c⁻ (cellule dendritiche plasmocitoidi) o CD11c⁺ (cellule dendritiche mieloidi) e l'espressione intracellulare delle citochine IL-10, IFN α , e IL-12 è stata determinata in queste popolazioni.

Risultati e Conclusione

I risultati di questo studio indicano che i DNA dei diversi ceppi hanno effetti diversi sulle PBMC e le cellule dendritiche. Nelle PBMC, i DNA dei 3 ceppi di bifidobacteria hanno indotto i più alti livelli di IL-10, rispetto ai DNA degli altri ceppi e il controllo. Una differenza nella produzione dell'IL-10 è stata osservata tra PBMC stimulate con DNA totale delle feci prima (T0) e dopo trattamento con i probiotici (T1), con elevati livelli della produzione dell'IL-10 e più bassi livelli della produzione dell'IL-1 β dopo modificazione della microflora. Per quanto riguarda le cellule dendritiche, al contrario di quello che è avvenuto con i controlli, i DNA dei ceppi probiotici hanno indotto la produzione di alti livelli di IL-10, bassi livelli di IL-12 e un rialzo transitorio dell'IFN α . Come per le PBMC, l'IL-10 era espressa a livelli più alti dai DNA dei bifidobacteria nelle cellule dendritiche e selettivamente nelle cellule dendritiche mieloidi; l'IFN α era espressa esclusivamente nelle cellule dendritiche plasmocitoidi (PDC).

In accordo con gli studi precedenti, i risultati di questo studio indicano che uno dei principali meccanismi d'azione dei probiotici potrebbe consistere nell'aumento della produzione della citochina regolatoria IL-10.

Modelli sperimentali per lo studio del cancro del colon: effetto di pre e probiotici sulla cancerogenesi del colon indotta da azossimetano nel ratto

Angelo Pietro Femia, Piero Dolara, Giovanna Caderni.
Dipartimento di Farmacologia, Università di Firenze

Il cancro del colon è una delle più comuni patologie nei Paesi occidentali e sia studi epidemiologici che sperimentali indicano che le abitudini alimentari influenzano fortemente il rischio di sviluppo di questa neoplasia. Tra i vari componenti della dieta che possono avere effetti protettivi, i prebiotici come i frutto-oligosaccaridi o fruttani e i probiotici, come i *Lactobacilli* e i *Bifidobacteria* hanno ricevuto grande attenzione negli ultimi anni in quanto alcuni studi suggeriscono che il loro consumo può inibire la cancerogenesi sperimentale (1-7). Carboidrati non digeribili, presenti in frutta e verdura, e in particolare i β (2-1)-fruttani derivati della cicoria, come l'oligofruttosio e l'inulina, sono in grado di stimolare la crescita di *Bifidobacteria* endogeni, che diventano il genere predominante nelle feci umane dopo un breve periodo di nutrimento (1). Reddy e coll. (2) hanno dimostrato che una dieta a base di oligofruttosio e inulina riduce i foci di cripte aberranti (ACF), lesioni preneoplastiche indotte da azossimetano (AOM), un cancerogeno colon-specifico che induce tumori intestinali attraverso un processo multistadio simile a quello osservato nella cancerogenesi umana spontanea. E' stato dimostrato che i frutto-oligosaccaridi a catena corta sono in grado di ridurre i tumori del colon in topi *Min*, un altro modello sperimentale per lo studio della cancerogenesi intestinale umana (3). I probiotici sono microrganismi vitali che assunti come componenti della dieta possono avere effetti benefici nell'intestino (1); inoltre, essi possiedono attività anticancerogena e antimutagenica (4). I *Lactobacilli*, forniti come supplementi dietetici, aumentano il periodo di latenza dell'insorgenza di tumori del colon indotti sperimentalmente nel ratto (5), e questo suggerisce che i *Lactobacilli* e i *Bifidobacteria* potrebbero inibire l'insorgenza di lesioni preneoplastiche e lo sviluppo di tumori in modelli animali.

Recentemente, è stato osservato che una combinazione di prebiotici e probiotici, i cosiddetti sinbiotici, potrebbero avere una maggiore attività sul colon rispetto ai singoli componenti (6). Infatti, Rowland e collaboratori (7) hanno dimostrato che, nel ratto, la somministrazione concomitante di inulina e *Bifidobacteria* nella dieta è più potente nell'inibire l'insorgenza degli ACF indotti da AOM rispetto ai due componenti dati separatamente. Quest'ultimo risultato, ottenuto usando modelli sperimentali di cancerogenesi a breve termine, non era però supportato da dati ottenuti in esperimenti di cancerogenesi a lungo termine.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo deciso di studiare se il prebiotico inulina arricchito con oligofruttosio (Raftilose- Synergy1[®], brevemente, Synergy1, 10% nella dieta), i probiotici (*Bifidobacterium lactis* (Bb12) e *Lactobacillus rhamnosus* (LGG), ciascuno alla concentrazione di 5×10^8 CFU/g di dieta) o i sinbiotici (una combinazione dei due) fossero in grado di inibire l'insorgenza di tumori nel colon indotti da azossimetano.

Gli animali, ratti maschi F344, sono stati suddivisi in: Controlli; PRE, nutriti con una dieta contenente Synergy 1; PRO, nutriti con una dieta contenente LGG e Bb12; PREPRO, contenente Synergy 1, LGG e Bb12. Dieci giorni dopo l'inizio del trattamento dietetico, i ratti sono stati trattati con AOM (15 mg/kg s.c x 2 volte); gli animali sono stati trattati con le differenti diete sperimentali per tutta la durata dell'esperimento. Trentuno settimane dopo l'AOM, i ratti trattati con Synergy 1 (gruppi PRE e PREPRO) avevano un numero di tumori (adenomi e carcinomi) significativamente più basso ($p < 0.001$) rispetto ai gruppi non trattati (il numero di tumori colorettali/ratto era 1.9 ± 1.7 , 1.1 ± 1.1 , 2.2 ± 1.4 e 0.9 ± 1.2 nei Controlli, PRE, PRO e PREPRO, rispettivamente, medie $\pm$ SD). Il numero di carcinomi era più basso nei gruppi trattati con i probiotici (gruppi PRO e PREPRO), anche se questo effetto non raggiunge la significatività statistica ($p = 0.079$). Inoltre, nei gruppi trattati con i probiotici, la percentuale di carcinomi rispetto al numero totale di tumori negli stessi gruppi era significativamente più basso ($p = 0.04$) rispetto ai non trattati suggerendo che il possibile effetto protettivo dei probiotici potrebbe esplicarsi principalmente nei tumori maligni.

Il contenuto cecale di acidi grassi a catena corta era più alto ($p < 0.001$) nei gruppi trattati con Synergy 1. L'indice apoptotico nella mucosa normale era più alto nel gruppo PRO. La proliferazione cellulare era più bassa nel gruppo PRE rispetto ai Controlli. In conclusione, una dieta contenente prebiotici è in grado di inibire la cancerogenesi intestinale indotta da AOM nel ratto; il possibile effetto chemopreventivo dei probiotici necessita di ulteriori indagini, ma i risultati suggeriscono che la combinazione di prebiotici e probiotici potrebbe avere effetti benefici.

Ringraziamenti: Supported by EU Project: QLKI-1999-00346.

Referenze

1. Roberfroid M.B. (2000). *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1682S-1687S
2. Reddy B.S., et al., (1997). *Carcinogenesis*, 18, 1371-1374.
3. Pierre F. et al., (1997). *Cancer Res.*, 57, 225-228.
4. Wollowski I., et al., (2001). *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 451S-455S.
5. Goldin B.R., and Gorbach S. L. (1980). *J.N.C.I.*, 64, 263-265.
6. Roberfroid M.B. (1998). *Br. J. Nutr.*, 80, S197-S202.
7. Rowland I.R et al., (1998). *Carcinogenesis*, 19, 281-28

Fattori coinvolti nel meccanismo di adesione di *Lactobacillus fermentum* a cellule Caco-2

Loredana Baccigalupi

Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università Federico II, via Mezzocannone 16 80134 Napoli

lorbacci@unina.it

I Lattobacilli sono batteri microaerofili, gram-positivi, normalmente presenti in gran numero nella microflora del tratto gastrointestinale (GI) umano. Insieme ad altri batteri isolati dal GI umano, molte specie di Lattobacilli vengono comunemente utilizzate per la preparazione commerciale di prodotti probiotici, con dichiarata attività benefica per la salute umana (1). Delle varie specie utilizzate come probiotici, solo per alcuni ceppi di *L. rhamnosus* (LGG), *L. johnsonii* (La1), *L. reuteri* (1063) e *L. plantarum* (299v) è stato dimostrato che sono in grado di sopravvivere alle condizioni estremamente acide dello stomaco e di aderire alle cellule epiteliali dell'intestino, colonizzandolo ed esercitando quindi effetti benefici, quali la diminuzione del livello di infezioni all'apparato digerente sia di origine batterica che virale (1). La capacità di sopravvivere a condizioni di elevata acidità, alla presenza dei sali biliari, di produrre sostanze ad attività antimicrobica e di aderire a cellule dell'epitelio intestinale sono considerate proprietà essenziali per considerare un ceppo batterico come probiotico (1).

Sulla base di tali criteri abbiamo identificato in una collezione di Lattobacilli isolati da alimenti, un ceppo con potenziale attività probiotica. Tale ceppo, denominato DRL36B, si mostrava in grado di sopravvivere a condizioni di pH 2,5 ed in presenza di elevate concentrazioni di sali biliari tossiche per la maggioranza degli altri lattobacilli analizzati. Inoltre, DRL36B, produceva sostanze antimicrobiche attive contro ceppi di *Salmonella*, *Staphylococcus* e *Listeria* e veniva classificato come *Lactobacillus fermentum* sulla base dell'allineamento della sequenza del suo RNA 16S con quelle presenti in banca dati. *L. fermentum* è una specie frequentemente isolata sia da prodotti caseari che tra la flora del tratto orale, gastrointestinale e genitale di diversi animali. Per alcuni isolati di *L. fermentum* è stata dimostrata la capacità di colonizzare il tratto urogenitale umano e di antagonizzare l'adesione di vari patogeni alle cellule epiteliali dell'intestino (2). Abbiamo quindi utilizzato il ceppo potenzialmente probiotico di *L. fermentum* da noi isolato, per analizzare la sua capacità adesiva in vitro a cellule Caco-2, cellule umane trasformate con caratteristiche di superficie simili a quelle degli enterociti, e successivamente per studiare il meccanismo di adesione. DRL36B si mostrava capace di aderire in vitro alle cellule Caco-2 con efficienza superiore a quella di alcuni probiotici commerciali (La1) e simile a quella di altri (LGG). Inoltre, l'adesione appariva dipendente dal pH del mezzo e mediata da un fattore associato non covalentemente alla superficie cellulare. Infatti, la capacità adesiva era quasi totalmente persa dopo lavaggio delle cellule con un tampone pH 4,5. L'analisi per HPLC del tampone di lavaggio metteva in evidenza vari picchi di assorbimento, uno dei quali corrispondente ad una frazione capace di ripristinare l'adesività delle cellule lavate alle Caco-2. Esperimenti di spettrometria di massa sono attualmente in corso, in collaborazione con l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del C.N.R. di Avellino, per definire la natura chimica del fattore di adesione.

Referenze:

1. Vaughan E.E., Mollet B. and de Vos W.M. (1999) *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 505-510.
2. Ouwehand A.C. and Conway P.L. (1996) *Journal of Applied Bacteriology* **80**, 311-318.

La malattia celiaca: novità e prospettive

Salvatore Auricchio

Dipartimento di Pediatria Università degli Studi di Napoli "Federico II" e Laboratorio Europeo per lo Studio delle Malattie Indotte da Alimenti.

La celiachia è un modello affascinante di malattia, ricco di sempre nuove acquisizioni. E' infatti una intolleranza permanente, molto diffusa (colpisce all'incirca 1% della popolazione umana), ad alimenti, da millenni, molto importanti nella alimentazione umana, da quando cioè l'uomo del neolitico da cacciatore è diventato dedito alla pastorizia ed all'agricoltura.

Le gliadine del grano e le altre prolamine dei cereali tossici per il celiaco, segale ed orzo, ad esse correlate, sono infatti proteine del tutto particolari nella loro struttura (sono formate in gran parte da glutammina e prolina e presentano sequenze aminoacidiche ripetitive).

Si tratta di proteine particolari per le loro caratteristiche tecnologiche e per la resistenza alla idrolisi intestinale, soprattutto a quella intraluminali delle proteasi gastriche e pancreatiche,.

Proprio grazie alla loro particolare struttura le gliadine sembrano capaci di interagire, in maniera del tutto particolare, con cellule e tessuti, in alcune fasi dello sviluppo. Tutto ciò potrebbe spiegare perché le gliadine sono praticamente le uniche proteine alimentari capaci di provocare danno permanente alla mucosa intestinale di soggetti geneticamente predisposti.

La celiachia è inoltre un esempio importante di interazione tra ambiente e individuo, nel quale non solo la particolarità dell'ambiente (la proteina alimentare innanzitutto, come detto sopra) ma anche la costituzione genetica dell'individuo giocano un ruolo fondamentale.

Essa si sta rivelando, infine, un modello affascinante per la comprensione di fenomeni basilari della patologia, quali i meccanismi della infiammazione, della risposta immune T cellulo-mediata, della autoimmunità, con effetti molteplici, a livello intestinale, ma anche in molti altri organi e tessuti, distanti dall'intestino stesso.

Va infine ricordato che molto del cammino fatto è partito dai primi tentativi di affrontare la comprensione di una patologia così complessa studiando gli effetti di frammenti della molecola della A-gliadina⁽¹⁾ in diversi sistemi in vitro, cellulari e di organi in sviluppo, e anche sull'intestino di celiaco in cultura⁽²⁾.

BIBLIOGRAFIA

1) de Ritis G, Auricchio S, Jones HW, Lew EJ, Bernardin JE, Kasarda DD

In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease.

Gastroenterology. 1988; 94:41-49.

2) Auricchio S, Maiuri L.

Is there a direct specific cytotoxic effect of gliadin on the intestinal mucosa in coeliac disease? (In Press) 10th International Symposium on Coeliac disease Paris 2-5 June 2002

Le librerie fagiche d'espressione nello studio della risposta anticorpale nel GALT

Roberto Marzari

Dipartimento di Biologia, Università di Trieste, via E. Weiss 2

34127 Trieste

marzari@units.it

Il Phage display di frammenti di immunoglobuline umane si è dimostrato un metodo particolarmente efficace nello studio della risposta anticorpale nelle patologie autoimmuni (1-3). Secondo questa metodica, il repertorio anticorpale è espresso come proteina di fusione con una proteina del rivestimento di un fago filamentoso. Ogni fago esprime sulla propria superficie un diverso anticorpo e contemporaneamente trasporta il relativo gene (4). In breve, le regioni variabili anticorpali delle catene pesanti VH e di quelle leggere VL vengono amplificate mediante PCR a partire da cDNA di linfociti, le regioni VH vengono unite stabilmente alle VL, formando quello che viene definito un single-chain antibody fragment (scFv). Il scFv viene infine clonato in un vettore fagmidico a monte del gene III codificante per la proteina minoritaria del rivestimento del fago M13. Dopo trasformazione, cellule batteriche di *E. coli* producono fagi che esprimono un anticorpo funzionale sulla loro superficie. Anticorpi specifici verso un determinato antigene possono essere isolati mediante cicli ripetuti di legame dei fagi su un antigene immobilizzato su fase solida. Questa tecnica è stata da noi usata per caratterizzare gli anticorpi prodotti da linfociti periferici e intestinali di tre pazienti affetti da Malattia celiaca (MC) (5). Nel corso di questo lavoro è stato possibile isolare anticorpi contro l'autoantigene transglutaminasi (tTG) da tutte le librerie fagiche di anticorpi da linfociti intestinali ma non da quelli periferici. Al contrario, anticorpi contro gliadina, il fattore scatenante la MC, possono essere ottenuti da tutte le librerie e questo dimostra che essi sono prodotti sia a livello intestinale che periferico. Gli anticorpi anti tTG selezionati sono stati classificati per appartenenza alle famiglie delle catene VH, alla sequenza dei CDR, alle mutazioni somatiche del framework e all'epitopo riconosciuto. In generale, l'uso dei geni VH è risultato essere ristretto a tre (VH5, VH3 e VH1) delle sette famiglie anticorpali VH, con molti dei geni appartenenti alla famiglia VH5 con un uso preferenziale del gene DP73. Questi risultati indicano un ruolo specifico del GALT nella risposta immunitaria della MC e delineano la possibilità che un analogo fenomeno sia alla base di altre forme di autoimmunità.

1. McIntosh, R. S., M. S. Asghar, P. F. Watson, E. H. Kemp, and A. P. Weetman. 1996. Cloning and analysis of IgG kappa and IgG lambda anti-thyroglobulin autoantibodies from a patient with Hashimoto's thyroiditis: evidence for in vivo antigen-driven repertoire selection. *J Immunol* 157:927.
2. Graus, Y. F., M. H. de Baets, P. W. Parren, S. Berrih-Aknin, J. Wokke, P. J. van Breda Vriesman, and D. R. Burton. 1997. Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies. *J Immunol* 158:1919.
3. Finnern, R., J. M. Bye, K. M. Dolman, M. H. Zhao, A. Short, J. D. Marks, M. C. Lockwood, and W. H. Ouwehand. 1995. Molecular characteristics of anti-self antibody fragments against neutrophil cytoplasmic antigens from human V gene phage display libraries. *Clin Exp Immunol* 102:566.
4. Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, and G. Winter. 1992. Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem* 267:16007.
5. Marzari, R., D. Sblattero, F. Florian, E. Tongiorgi, T. Not, A. Tommasini, A. Ventura, and A. Bradbury. 2001. Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol* 166:4170.

Modelli in vivo e in vitro per lo studio degli effetti protettivi di nutrienti contro le infiammazioni e i danni indotti da patogeni

M. Roselli ., A. Finamore A., M.S. Britti e E. Mengheri

Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178 Roma

E' ormai noto che esiste un dialogo e un'interazione costante tra cellule epiteliali, sistema immunitario intestinale e microflora. La mucosa intestinale, oltre ad essere la mucosa assorbente degli alimenti, rappresenta una barriera difensiva contro eventuali patogeni. Il sistema immunitario intestinale, che è il tessuto immunitario più esteso, deve essere in grado di proteggere la mucosa contro i patogeni ma deve anche evitare reazioni di ipersensibilità contro proteine alimentari, la normale flora batterica ed altre molecole ambientali. La tolleranza orale è la soppressione specifica della risposta immunitaria contro un antigene somministrato oralmente e successivamente iniettato, per prevenire reazioni immunitarie indesiderate (Strobel, 1998). Si ritiene che la rottura della tolleranza orale può portare allo sviluppo di patologie immunitarie della mucosa causate da reazioni contro antigeni alimentari o ambientali e addirittura contro autoantigeni con conseguente comparsa di malattie autoimmuni. La microflora intestinale gioca anch'essa un ruolo fondamentale nel mantenere l'intestino in buona salute attraverso interazione tra batteri che porta a un riequilibrio della microflora, e interazione con le cellule intestinali stesse. Nei nostri modelli sperimentali, in vivo e in vitro, abbiamo affrontato alcuni aspetti di queste interazioni e di come alcuni alimenti come lo zinco e i probiotici, possono prevenire o proteggere lo sviluppo di infiammazioni e danni indotti da un batterio patogeno. E' noto che lo zinco interviene in molteplici funzioni, ed è fondamentale per le difese immunitarie. I probiotici sono microrganismi che, usati in numero sufficiente, esercitano effetti benefici sulla salute dell'ospite. Gli effetti più noti svolti dai probiotici comprendono l'equilibrio della microflora endogena, protezione contro patogeni e modulazione della risposta immunitaria. Per quanto riguarda lo zinco, in un modello in vivo di ratti carenti in zinco, abbiamo visto che la carenza di zinco induceva infiammazione e lesioni ai villi in dipendenza della severità della carenza. Abbiamo anche visto che era sufficiente una carenza di zinco di pochi giorni per sopprimere l'induzione della tolleranza orale, e abbiamo ipotizzato che questo era una delle cause dell'infiammazione trovata in carenza di zinco (Finamore et al. 2003). Poiché diversi lavori hanno indicato un effetto antiinfiammatorio da parte dello zinco, abbiamo voluto verificare se e attraverso quali meccanismi lo zinco potesse proteggere le cellule intestinali da infezione di un batterio patogeno, utilizzando un modello in vitro di cellule intestinali, le Caco-2, infettate con *Escherichia coli* enterotossico (ETEC). I nostri risultati hanno indicato che lo ZnO era in grado di inibire l'adesione e l'invasività del batterio, e di impedire l'aumento delle citochine infiammatorie. Per quanto riguarda i probiotici, utilizzando il modello di ratti carenti in zinco abbiamo visto che il trattamento con il probiotico *Bifidobacterium animalis* era in grado di proteggere l'intestino dai danni indotti dalla carenza di zinco, in termini di integrità della mucosa, normalizzazione della proliferazione delle cellule staminali delle cripte e di quella delle attività degli enzimi disaccaridasi (Mengheri et al. 1999). Altri esperimenti condotti su ratti in condizioni fisiologiche, tollerizzati o immunizzati con ovalbumina, hanno messo in evidenza che il trattamento con i probiotici *Lactobacillus casei* e *B. animalis* induceva una risposta di tipo tollerogenico a livello intestinale e non periferico, con ridotta risposta proliferativa dei linfociti mesenterici in seguito a stimolazione in vitro con l'antigene ovalbumina, indotta da aumentata espressione di IL-10. Utilizzando il modello in vitro di cellule Caco-2, abbiamo evidenziato che questi probiotici, malgrado la mancata protezione sull'apertura delle giunzioni indotta da ETEC, riducevano l'invasività di ETEC e lo sviluppo delle reazioni infiammatorie.

Referenze

1. Finamore A., Roselli M., Merendino N., Nobili F., Vignolini F., Mengheri E. - Zinc deficiency suppresses the development of oral tolerance in rats. *J. Nutr.* 2003, 133: 191-198.
2. Mengheri E., Nobili F., Vignolini F., Pesenti M., Brandi G., Biavati B. - *Bifidobacterium animalis* protects intestine from damage induced by zinc deficiency in rats. *J. Nutr.* 1999, 129: 2251-2257.
3. Strobel S., Mowat A.M. - Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today* 1998, 19: 1743-181.

Glutine ed autoimmunità: il modello del diabete tipo I

Riccardo Troncone, Francesco Maurano, Giuseppe Mazzarella, Rosita Stefanile, Mauro Rossi
Laboratorio Europeo per lo Studio delle Malattie Indotte da Alimenti, Università Federico II, Napoli & Istituto di Scienza dell'Alimentazione CNR, Avellino

Il diabete tipo I è una malattia autoimmune che si manifesta in individui geneticamente suscettibili. Fattori ambientali, quali antigeni alimentari e virus, sono stati associati allo sviluppo di questa condizione. Il sistema immunitario intestinale è anche per questo ritenuto svolgere un ruolo importante: nei pazienti diabetici si osservano segni di disregolata risposta immunologica ad antigeni alimentari; le cellule T presenti nel pancreas presentano recettori per l'homing intestinale; l'intestino, pur presentando una normale morfologia, presenta segni di infiammazione, come evidenziato da studi di immunoistochimica e dal profilo delle citochine mucosali. Molto interessante infine è la stretta associazione riportata tra malattia celiaca e diabete di tipo I. Più nello specifico esistono indizi che suggeriscono nei pazienti con diabete tipo I una abnorme risposta mucosale alla gliadina: in questo senso depongono studi di challenge rettale con glutine e studi in un sistema di cultura d'organo del piccolo intestino.

Il topo diabetico non obeso (NOD) è un modello molto studiato di diabete autoimmune; questi animali sviluppano insulite, una precoce infiltrazione di linfociti nel pancreas che esita nel diabete conclamato. Studiando questo modello è risultato chiaro il coinvolgimento del tessuto linfoide associato all'intestino; infatti, linfociti esprimenti le molecole di adesione sono stati ritrovati nelle isole pancreatiche; linfonodi mesenterici provenienti da animali NOD di 3 settimane sono capaci di trasferire la malattia. Nei topi NOD ma anche nei ratti BB, un altro modello ben caratterizzato di diabete, è stato chiaramente dimostrato che la dieta modifica l'influenza del diabete. Recentemente anche nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato come una dieta priva di glutine possa diminuire il rischio di diabete. Abbiamo inoltre documentato i segni di una enteropatia legata alla presenza di glutine nella dieta.

In conclusione, sia in modelli animali di diabete che in pazienti affetti da diabete tipo I appare evidente il coinvolgimento del sistema immune associato all'intestino. Sono anche presenti i segni di compromessa tolleranza orale nei confronti del glutine. Il possibile ruolo del glutine stesso nell'attivare il processo autoimmune e i meccanismi sottesi necessitano di ulteriori studi.

1. Vaarala O: The gut immune system and type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 958:39-46, 2002.
2. Hänninen A, Salmi M, Simell O, Jalkanen S: Mucosa-associated (beta 7-integrin) lymphocytes accumulate early in the pancreas of NOD mice and show aberrant recirculation behavior. *Diabetes* 45:1173-1180, 1996.
3. Paronen J, Klemetti P, Kantele JM, Savilahti E, Perheentupa J, Åkerblom HK, Vaarala O: Glutamate decarboxylase-reactive peripheral blood lymphocytes from patients with IDDM express gut-specific homing receptor alpha4beta7-integrin. *Diabetes* 46: 583-588, 1997.
4. Savilahti E, Ormala T, Sukkonen T, Sandini-Pohjavouri U, Kantele JM, Arato A, Ilonen J, Åkerblom HK : Jejuna of patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) shows signs of immune activation. *Clin Exp Immunol* 116:70-77, 1999.
5. Troncone R, Franzese A, Mazzarella G, Paparo F, Auricchio R, Mayer M, Greco L: Gluten sensitivity in a subset of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol* 98:590-5, 2003.
6. Flohe SB, Wasmuth HE, Kerad JB, Beales P.E, Pozzilli P, Elliot R.B, Hill J.P, Scott F. W, Kolb H: A wheat-based diabetes-promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine* 21(3):149-54, 2003.

Meccanismi immunologici di danno mucosale in corso di enteropatie

Rachele Ciccocioppo, *Antonio Di Sabatino, *Gino Roberto Corazza

Dipartimento di Medicina Interna e Sanità Pubblica, Università di L'Aquila;

*Unità di Gastroenterologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

Le due principali enteropatie umane che riconoscono una patogenesi immunologica sono rappresentate dal morbo di Crohn e dalla malattia celiaca. In entrambe le condizioni, affinché si realizzi il danno tissutale, è necessaria l'interazione di fattori ambientali, rappresentati dalla flora batterica nel morbo di Crohn e dal glutine nella malattia celiaca, di fattori genetici, rappresentati da mutazioni del gene CARD15/NOD2 nel primo caso e dagli alplotipi HLA-DQ2 o DQ8 nel secondo, nonché di fattori immunologici rappresentati da una perdita della tolleranza nei confronti di antigeni batterici o alimentari rispettivamente, e dalla presenza di una risposta infiammatoria che in entrambi i casi risulta essere mediata dai linfociti T e da citochine di tipo T helper-1. Comunque, il danno della mucosa intestinale, caratterizzato in entrambi i casi da un notevole aumento dell'apoptosi enterocitaria, risulta essere completamente diverso: presenza di lesioni della parete intestinale a tutto spessore con ulcere e fissurazioni che possono esitare in fistole, granulomi e fitto infiltrato infiammatorio con completo sovvertimento dell'architettura mucosale fino alla fibrosi, con interessamento segmentale di qualunque tratto del tubo digerente, anche se più frequentemente nell'ileo distale, nel morbo di Crohn, mentre presenza di atrofia dei villi intestinali con iperplasia delle cripte e fitto infiltrato infiammatorio sia dell'epitelio che della lamina propria con una estensione delle lesioni per continuità e con gravità decrescente dal duodeno all'ileo nella malattia celiaca.

La cascata immunologica responsabile del danno tissutale nelle due condizioni patologiche presenta delle peculiarità che cercheremo di ricostruire in base alle evidenze scientifiche a tutt'oggi disponibili. Un fattore a sé stante e comunque fondamentale in entrambi i casi, è rappresentato dalla rottura della barriera intestinale che determina un'aumentata permeabilità agli antigeni precedentemente citati e che, pertanto, si ritiene essere il *primum movens*. In uno stadio iniziale, infatti, gli antigeni opportunamente captati e processati dalle cellule dendritiche, vengono presentati ai linfociti T regolatori che a loro volta stimolano i linfociti T CD4⁺. La secrezione di particolari citochine, verosimilmente l'IL-12 nel morbo di Crohn e l'IFN- α nella malattia celiaca, farebbe sì che si abbiano l'attivazione e la proliferazione di tali linfociti. A loro volta, questi produrrebbero un pattern citochinico in cui l'IFN- γ e l'IL-15 sarebbero up-regolati in entrambe le condizioni, mentre, contrariamente a ciò che si riteneva fino a poco tempo fa, il TNF- α risulterebbe aumentato solo nel morbo di Crohn. In quest'ultima condizione, i meccanismi coinvolti nel mantenimento dell'abnorme proliferazione T-cellulare e del conseguente linfoaccumulo sono rappresentati da un deficit di molecole ad azione anti-infiammatoria (TGF- β 1 ed IL-10), nonché da un difetto di apoptosi T-linfocitaria mediato dall'azione di alcune citochine quali l'IL-6, l'IL-15 ed il TNF- α . In particolare, per ciò che riguarda il ruolo del TGF- β 1, è ormai riconosciuta la sua importanza nel mantenimento della tolleranza e quindi della infiammazione della mucosa intestinale in un ambito fisiologico attraverso il contenimento della produzione di IFN- γ e TNF- α . Nella mucosa dei pazienti affetti da morbo di Crohn, sono stati dimostrati aumentati livelli di SMAD7, una proteina intracellulare coinvolta nella riduzione della trasduzione del segnale del TGF- β al nucleo che, pertanto, causerebbe un aumento della sintesi di citochine pro-infiammatorie.

Ulteriore evento cruciale nel determinismo delle lesioni proprie del morbo di Crohn e, soprattutto, nella cronicizzazione della malattia, è rappresentato dal deficit di apoptosi linfocitaria per cui verrebbe meno quel fisiologico meccanismo di morte cellulare programmata necessario per arginare la risposta infiammatoria. Evidenze sperimentali hanno dimostrato come i linfociti della lamina propria isolati da tali pazienti siano resistenti all'apoptosi stimolata via CD2 e via Fas, probabilmente a causa dell'aumentato rapporto tra la proteina anti-apoptotica Bcl-2 e la pro-apoptotica Bax. Tra i possibili fattori implicati nella riduzione della suscettibilità dei linfociti T ad andare incontro ad apoptosi, vi è il recettore solubile della IL-6 che, rilasciato dai macrofagi, si complessa con l'IL-6 e stimola la glicoproteina gp130 sulla superficie degli stessi linfociti, portando, attraverso un aumento della trascrizione dei geni anti-apoptotici BCL-2 a BCL-x_L, ad una resistenza ad andare incontro a morte cellulare programmata. Infine, ad avere un'ulteriore funzione inibitoria sull'apoptosi, vi è lo stesso TNF- α , evento che a prima vista può sembrare paradossale, avendo tale citochina un recettore di membrana coinvolto nell'innescare del programma di morte intracellulare, tuttavia il TNF- α , attraverso una via alternativa, è in grado di determinare la traslocazione nel nucleo dell'NF- κ B che, a sua volta, indurrebbe la trascrizione di geni che favoriscono da una parte la sopravvivenza cellulare, e dall'altra codificano per IL-1, IL-6 e TNF- α , determinando la generazione di un feedback positivo che automanterrebbe la risposta infiammatoria. A conferma di ciò, il meccanismo attraverso cui l'anticorpo monoclonale chimerico anti-TNF- α , infliximab, avrebbe una così critica efficacia terapeutica, risiederebbe proprio nella capacità di ripristinare la suscettibilità linfocitaria all'apoptosi.

Un potenziale ruolo anti-apoptotico sarebbe svolto anche dall'IL-15, citochina T helper-1 prodotta dai macrofagi attivati nonché, in condizioni infiammatorie, anche dalle cellule epiteliali, che esplicherebbe la propria azione anti-apoptotica probabilmente mediante un'upregolazione della espressione intracellulare di Bcl-2.

L'anello di congiunzione tra tale perversa attivazione linfocitaria ed il danno mucosale con l'aumentata apoptosi enterocitaria nel morbo di Crohn, non è rappresentato dal sistema Fas/Fas ligando come sarebbe logico pensare, bensì dalla produzione di un particolare pattern di metalloproteasi dominato dalla metalloproteasi-1 o collagenasi interstiziale e dalla -3 o stromelisin. In particolare, quest'ultima è tipicamente presente a livello intestinale in corrispondenza di lesioni ulcerative anche a genesi differente e, comunque, entrambe sarebbero responsabili sia del rimaneggiamento della matrice extracellulare che si osserva in questa malattia, che della degradazione della membrana basale epiteliale che causerebbe, a sua volta, l'innescio della morte enterocitaria attraverso una particolare forma di apoptosi, detta anoichisi.

Infine, sempre in prossimità delle lesioni ulcerative, l'epitelio di superficie, presenta ridotti livelli di E-caderina, la componente transmembrana delle giunzioni aderenti responsabile dell'integrità del contatto cellula-cellula e, all'interno della cellula, dell'ancoraggio al citoscheletro, evento questo che favorirebbe la migrazione delle cellule epiteliali verso il sito della perdita di sostanza al fine di una sua riparazione.

Completamente diversa appare la sequenza di eventi immunologici che causa il danno mucosale nella malattia celiaca. Infatti, dopo la captazione degli epitopi della gliadina nativa e/o dei frammenti deamidati ad opera della transglutaminasi tessutale da parte delle cellule antigene-presentanti, e dopo la loro processazione e complessazione con gli eterodimeri DQ2 e DQ8 espressi sulla superficie di tali cellule, avviene il riconoscimento da parte dei linfociti T CD4⁺ che, una volta attivati, produrrebbero citochine pro-infiammatorie tra cui l'IFN- γ , l'IL-6, la IL-15 e la IL-18. Contrariamente al morbo di Crohn, nella malattia celiaca attiva non sono state trovate alterazioni nei livelli di IL-10, TGF- β 1 e del fattore nucleare NF-kB e nemmeno una resistenza dei linfociti della lamina propria all'apoptosi, mentre un ruolo cruciale nel determinismo dell'aumentata apoptosi enterocitaria, è giocato da entrambi i principali meccanismi citolitici dei linfociti T attivati, ossia i sistemi Fas/Fas ligando e perforina/granzyme. Inoltre, nostri recenti dati hanno evidenziato come l'IFN- γ sia responsabile della produzione di un particolare pattern di metalloproteasi dominato dalla metalloproteasi-12 o metalloelastasi, i cui livelli correlano sia con l'entità dell'atrofia dei villi intestinali morfometricamente valutata, sia con il grado di apoptosi enterocitaria, oltretutto dalla -1 e dalla -9. Tale peculiare pattern enzimatico causerebbe sia la degradazione della matrice extracellulare che della membrana basale epiteliale, ma senza perdita di sostanza. L'importanza di questa risposta T helper-1 è sottolineata dal fatto che il liquido sopranatante di cloni T cellulari gliadina-specifici isolati dalla mucosa intestinale di pazienti, provoca, se posto in coltura con mucosa intestinale di soggetti normali, un danno del tutto analogo a quanto si riscontra in corso di malattia attiva.

In comune col morbo di Crohn invece osserviamo l'azione antiapoptotica della IL-15 sui linfociti intraepiteliali, ma non su quelli della lamina propria, linfociti che, attraverso una loro permanente attivazione o proliferazione, sarebbero responsabili dell'insorgenza di complicanze quali la malattia celiaca refrattaria o il linfoma intestinale, due condizioni che, alla luce di recenti evidenze, appaiono rappresentare le fasi iniziale e finale di un *continuum* biologico.

Infine, nostri recenti risultati ancora non pubblicati, hanno evidenziato come i livelli di E-caderina enterocitaria in corso di malattia celiaca, siano sovrapponibili a quelli di soggetti di controllo e siano quindi probabilmente responsabili del mantenimento di una sorta di barriera intestinale che non permetta la formazione di "buchi" nell'epitelio nonostante l'elevato grado di apoptosi enterocitaria. Completamente deregolate sono risultate invece le molecole strutturali delle giunzioni strette. Questo particolare assetto, potrebbe essere alla base della selettiva alterazione della permeabilità intestinale osservata in corso di malattia celiaca.

In conclusione, molte sono le recenti acquisizioni nel campo dei meccanismi immunologici responsabili della patogenesi delle lesioni intestinali in corso di enteropatia che non solo ci consentono di fare un distinguo tra le due principali patologie ma, nell'ambito della singola malattia, di riuscire ad identificare differenti fasi della malattia, nonché i fattori implicati nel singolo paziente. Tutto ciò porterà, in un prossimo futuro, a poter disporre di una terapia ad personam.

Meccanismi di induzione della tolleranza immunologica ad alimenti

Mauro Rossi, Francesco Maurano, Paolo Bergamo, Stefania Senger, Diomira Luongo, Rossana D'Arienzo.

Istituto di Scienze dell'Alimentazione, CNR, Via Roma 52, 83100 Avellino.
mrossi@isa.cnr.it

Le cellule del sistema immune sono sottoposte ad una serie di processi tesi ad impedire la reattività verso gli antigeni alimentari. Il risultato che ne consegue è uno stato definito di tolleranza immunologica, un fenomeno immunologicamente attivo caratterizzato da assenza di risposta antigene-specifica. Il sito di generazione della tolleranza orale non è ancora stato definito con precisione: potrebbe essere rappresentato dalle stesse placche del Peyer, già caratterizzato come organo di induzione della risposta immune mucosale a patogeni. In realtà, è abbastanza probabile che l'intera superficie della mucosa intestinale sia coinvolta nella generazione di tolleranza. I meccanismi cellulari coinvolti nella tolleranza orale sono molteplici e la loro attivazione dipende dalla quantità di antigene somministrato attraverso la mucosa. A dosi elevate, l'antigene è processato da APC non professionali o APC professionali immature, carenti di segnali costimolatori. In assenza di tali segnali le cellule T vanno incontro a fenomeni di anergia ed apoptosi. A dosi più basse di antigene risultano invece attivate una serie di cellule T regolatorie Ag-specifiche, secernenti citochine soppressorie. La tolleranza orale è stata inoltre utilizzata per sviluppare protocolli immunomodulatori in modelli animali di patologie autoimmuni, quali il diabete, artrite reumatoide ed encefalomielite, aprendo pertanto la possibilità di una sua applicazione terapeutica nell'uomo.

Tra le patologie intestinali immunomediate la celiachia rappresenta un modello ideale per lo sviluppo di protocolli tesi al recupero della tolleranza immunologica, perché l'antigene responsabile dell'insorgenza della malattia è noto (la gliadina) ed è accertata la sua stretta associazione con la presenza di specifiche molecole HLA, gli eterodimeri DQ2 o DQ8. Esistono comunque degli ostacoli per la realizzazione di un tale protocollo immunomodulatorio, essenzialmente legati alla eterogeneità della gliadina, che è in realtà una miscela di diverse componenti, ed alla necessità di utilizzare una via di somministrazione alternativa a quella orale, essendo la celiachia caratterizzata da enteropatia. A questo proposito abbiamo verificato, in una serie di esperimenti, l'efficacia di un protocollo di somministrazione di alfa-gliadina ricombinante attraverso il naso, nel sopprimere la risposta sistemica ad una preparazione commerciale di gliadina in topi transgenici per il DQ8. Considerata la connessione tra i diversi compartimenti mucosali, non appare improbabile che questa strategia possa risultare efficace non solo a livello sistemico ma anche intestinale. Esperimenti sono in corso per rispondere a questo quesito.

L'esistenza di un meccanismo inducibile di tolleranza immunologica a livello intestinale ha evidenziato la possibilità di utilizzare particolari alimenti che, come tali o geneticamente modificati, siano in grado di intervenire in processi autoimmunitari. Un esempio interessante, descritto recentemente in letteratura, è rappresentato da un ceppo ricombinante di *Lactobacillus casei* esprimente un peptide della proteina mielinica basica che, somministrato per via orale in un modello animale di encefalomielite, ha prodotto la regressione della malattia. Un altro interessante esempio di alimento capace di modulare la risposta immune, è rappresentato dall'acido linoleico coniugato (CLA), presente nei prodotti lattiero-caseari. Studi *in vitro* effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato la capacità del CLA di sopprimere la proliferazione cellulare in cellule T, mediante induzione di apoptosi.

In conclusione, il fenomeno della tolleranza orale è un evento fisiologico complesso, ma esiste la possibilità di utilizzarlo a scopi terapeutici per il recupero sia di intolleranze alimentari che, più in generale, di patologie autoimmuni.

Referenze utili

1. S Strobel, A Mcl Mowat. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunology Today* 1998; 19: 173-181.
2. Senger S, Luongo D, Maurano F, Mazzeo MF, Siciliano RA, David C, Troncone R, Auricchio S, Rossi M. Intranasal administration of a recombinant α -gliadin down-regulates the immune response to wheat gliadin in DQ8 transgenic mice. *Immunol Letters* 2003; 88(2): 127-134
3. CB Maassen, JD Laman, C van Holten-Neelen, L Hoogteijling, L Groenewegen, L Visser, MM Schellekens, WJ Boersma, E Claassen. Reduced experimental autoimmune encephalomyelitis after intranasal and oral administration of recombinant lactobacilli expressing myelin antigens. *Vaccine*. 2003; 21(32):4685-4693.

Ruolo dell'IL-10 nella soppressione della risposta infiammatoria glutine dipendente nell'intestino celiaco

Carmen Gianfrani
Istituto di Scienze dell'Alimentazione, CNR, Avellino.

La caratteristica della malattia celiaca è un enteropatia del piccolo intestino, caratterizzata da una alterata morfologia dell'architettura dei villi, spesso accompagnata da malassorbimento. Il danno mucosale è dovuto ad una reazione di ipersensibilità ritardata alla gliadina con una massiva attivazione di cellule Th1 secernenti alti livelli di IFN- γ . L'IL-10 è un'importante citochina immunoregolatoria che agisce sia sulle cellule presentanti l'antigene inibendone la sintesi di citochine e l'espressione dell'MHC-II e molecole costimolatorie, che direttamente sulle cellule T effettrici su cui induce una prolungata non responsività antigene-specifica. Inoltre, l'IL-10 è un fattore chiave per la differenziazione di cellule regolatorie di tipo 1 (Tr1) che sono capaci di sopprimere la risposta immune di tipo Th1 *in vivo* e *in vitro* attraverso la secrezione di IL-10 e TGF- β . Tali cellule sono state dimostrate sia nell'uomo che nel topo e con differenti specificità antigeniche.

Abbiamo recentemente osservato un aumento dei livelli di trascritti per IL-10 nella mucosa dei pazienti celiaci in fase acuta rispetto a pazienti trattati e ai controlli normali. Poiché il rapporto tra i livelli di mRNA per IL-10 e IFN- γ era significativamente più basso nella mucosa dei celiaci non trattati e infiammati rispetto ad altre enteropatie, ciò ha suggerito fortemente che gli alti livelli di IL-10, che presumibilmente riflettono un pathway compensatorio antinfiammatorio, non sono sufficienti a sopprimere la schiacciante risposta mediata dalle cellule Th1 nella malattia celiaca attiva. In fine, culture d'organo *ex vivo*, sia delle biopsie dei celiaci trattati che dei non trattati, mostra che l'aggiunta di rhIL-10 esogena riduce l'attivazione delle cellule Th1 indotta dalla gliadina. Infatti, noi abbiamo osservato una diminuzione del numero delle cellule CD25⁺ e B7-1⁺ e dell'espressione dell'mRNA per IFN-gamma e IL-2. Successivamente, abbiamo studiato il meccanismo coinvolto nella soppressione dell'infiammazione mucosale scatenata dalla gliadina. In particolare ci interessava capire se il trattamento *in vitro* con IL-10 della mucosa di pazienti celiaci tenuti a dieta senza glutine inducesse un lungo stato di anergia dei linfociti T intestinali gliadina-specifici. I nostri dati suggeriscono che il trattamento di campioni biotici in remissione con IL-10 sopprime la risposta T effettrice alla gliadina e che tale soppressione è duratura nel tempo.

La presenza di cellule Tr1 nella mucosa intestinale dei pazienti con malattia celiaca è stata esplorata clonando linee cellulari T specifiche generate da biopsie trattate coltivate *ex vivo* con gliadina in presenza o assenza di IL10 esogena.

Il ruolo delle cellule T regolatorie gliadina-specifiche nella mucosa intestinale di pazienti celiaci viene infine discusso.