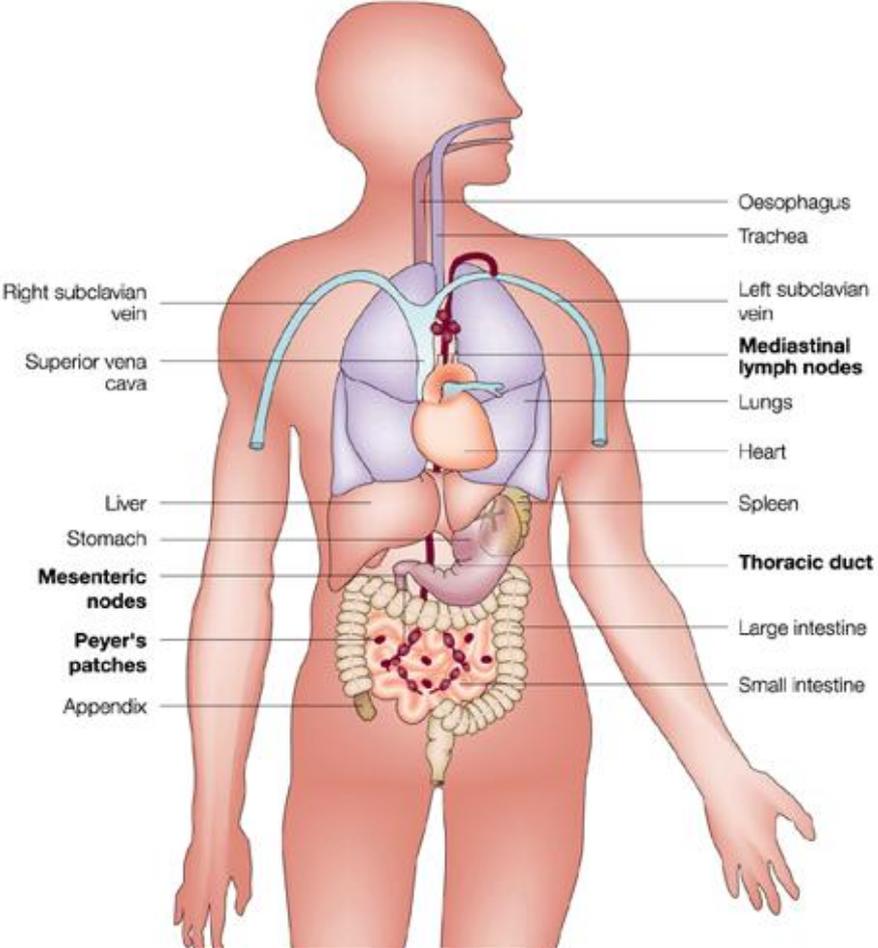


Mucosal Immunology



Mucosal tissues

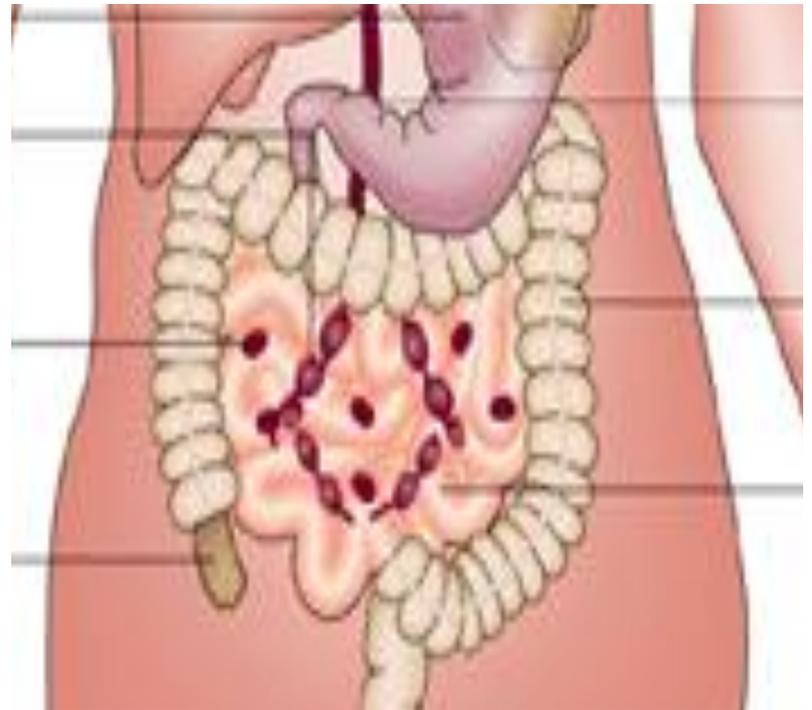
- Strict contact with external antigens
- A barrier against the entrance of microorganisms
- Absorb, digest and exchange nutrients (intestine)
- Contain the largest component of immune system (almost of 60% of all T cells in the body)

MALT: mucosa associated lymphoid system

- NALT: Nasal associated l.s. (Waldeyer's ring: palatine tonsils, adenoids)
- BALT: Bronchus associated l.s.
- **GALT**: Gut associated l.s.
- Urogenital associated l.s.

The gut associated lymphoid tissue (GALT)

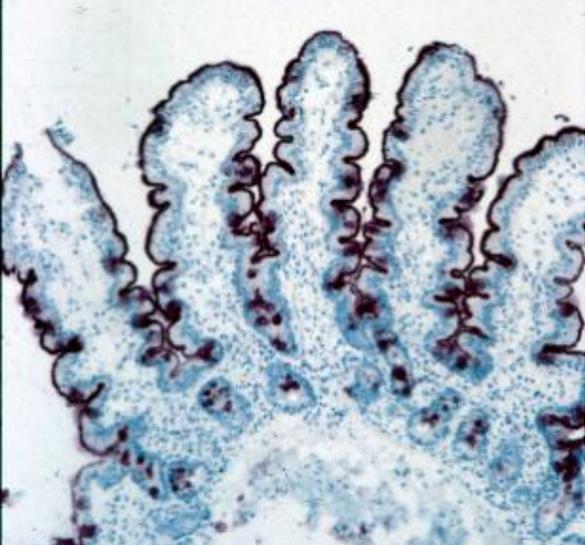
- GALT represents one of the largest and most complex part of the immune system
- GALT does encounter a big variety of antigens than any other part of the organism



GALT is functionally and anatomically different from peripheral immune system

GALT immune cells are organized in

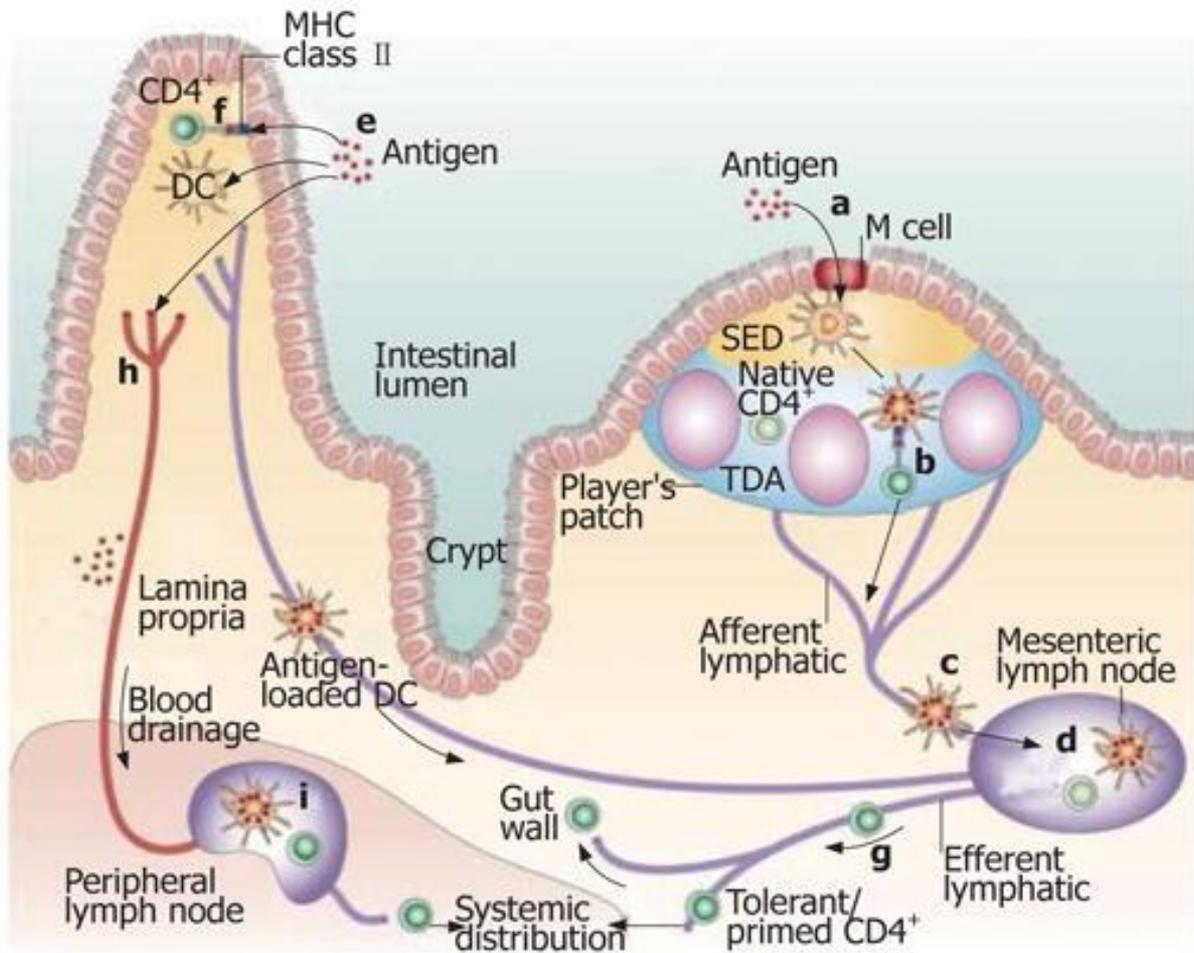
- Specialized tissue i.e. Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, cryptopatches
- Scattered throughout intestinal mucosa (lamina propria and epithelium)



Small intestine

Scattered GALT

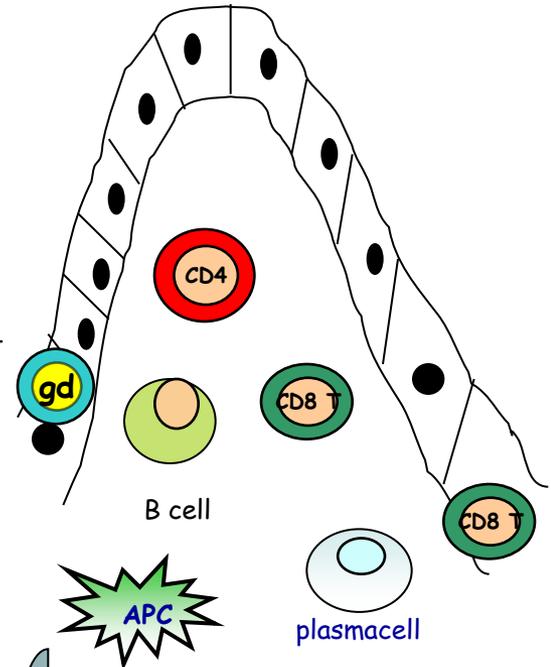
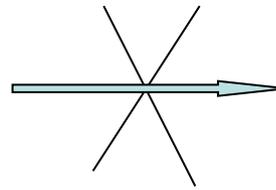
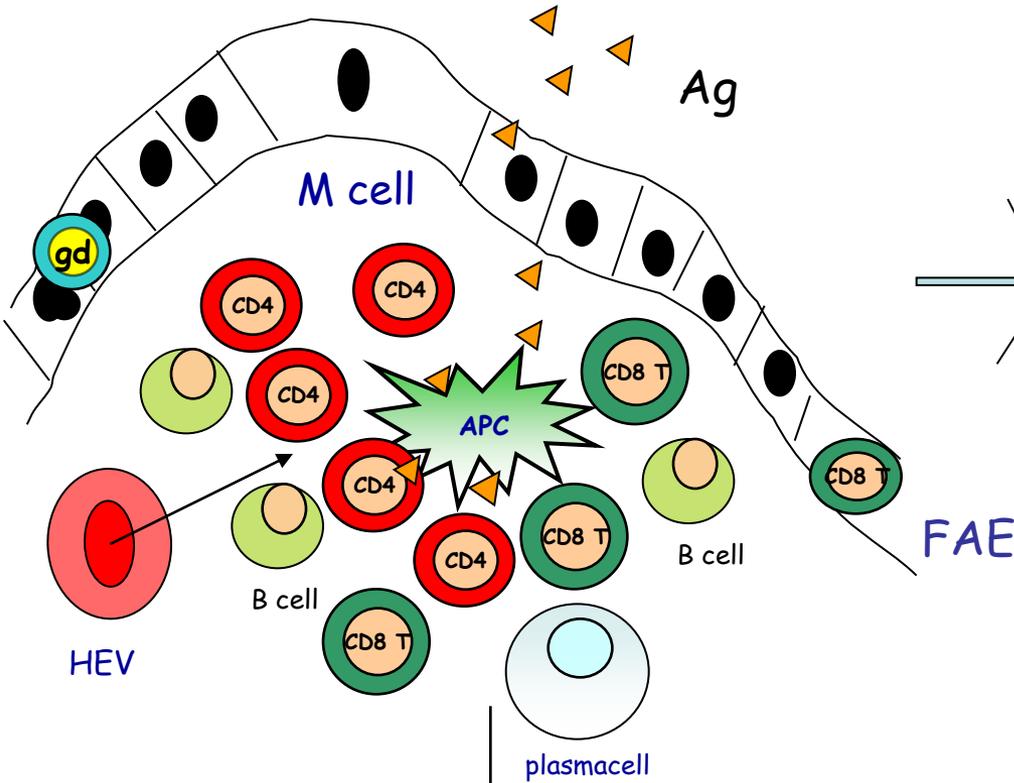
Peyer's patches



Organized tissues

Scattered lymphoid cells

Peyer's patches



Inductive site (priming)

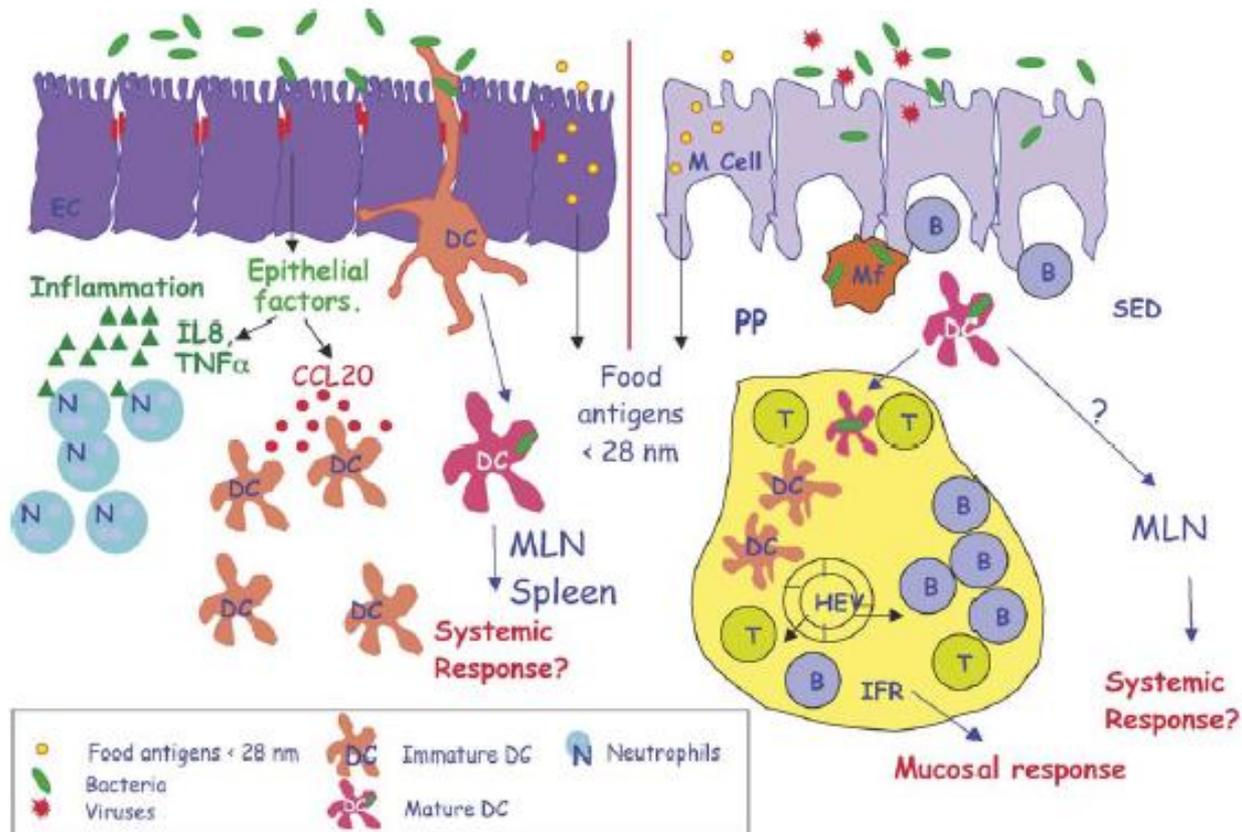
Effector site



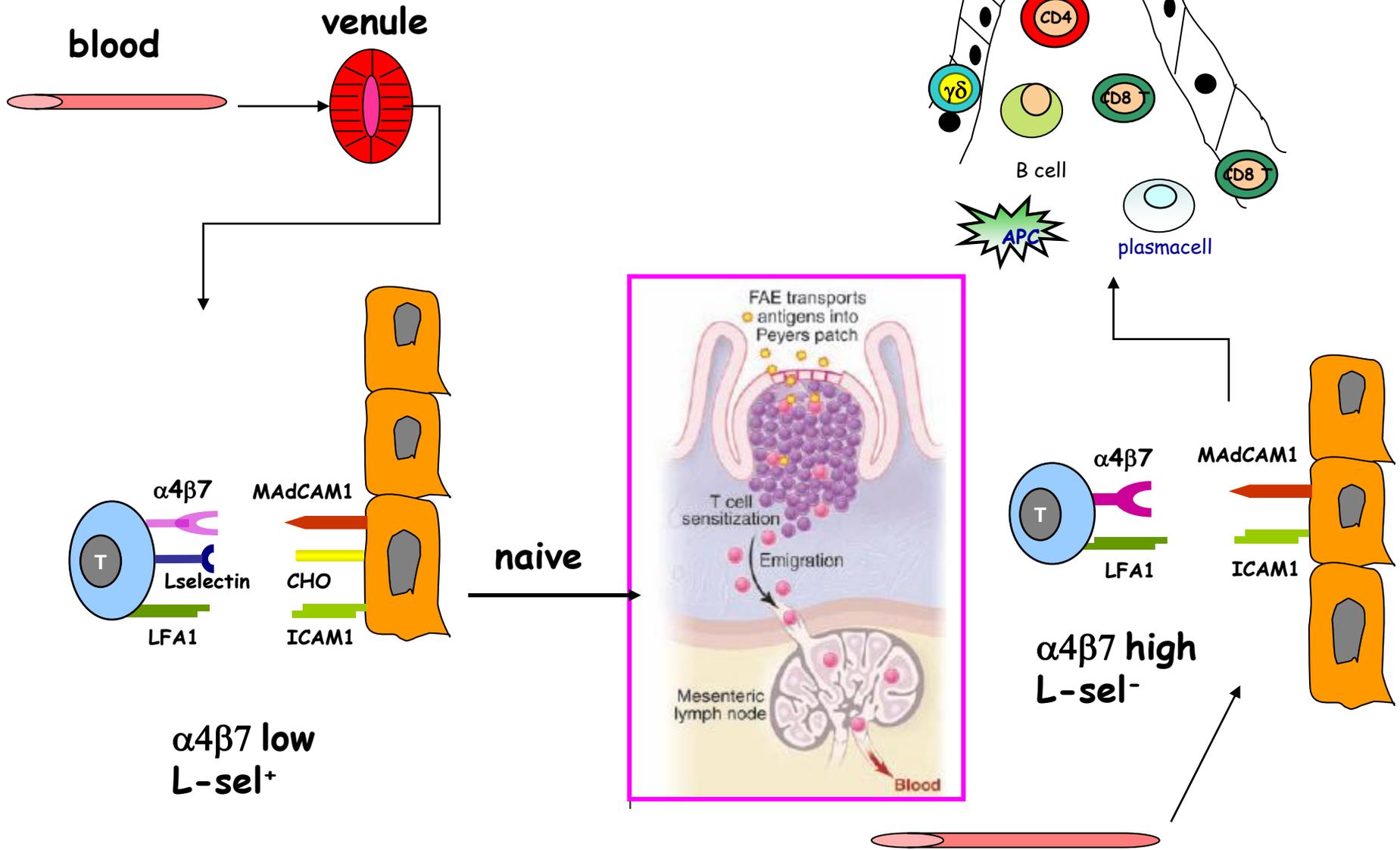
Thoracic duct

Peripheral blood

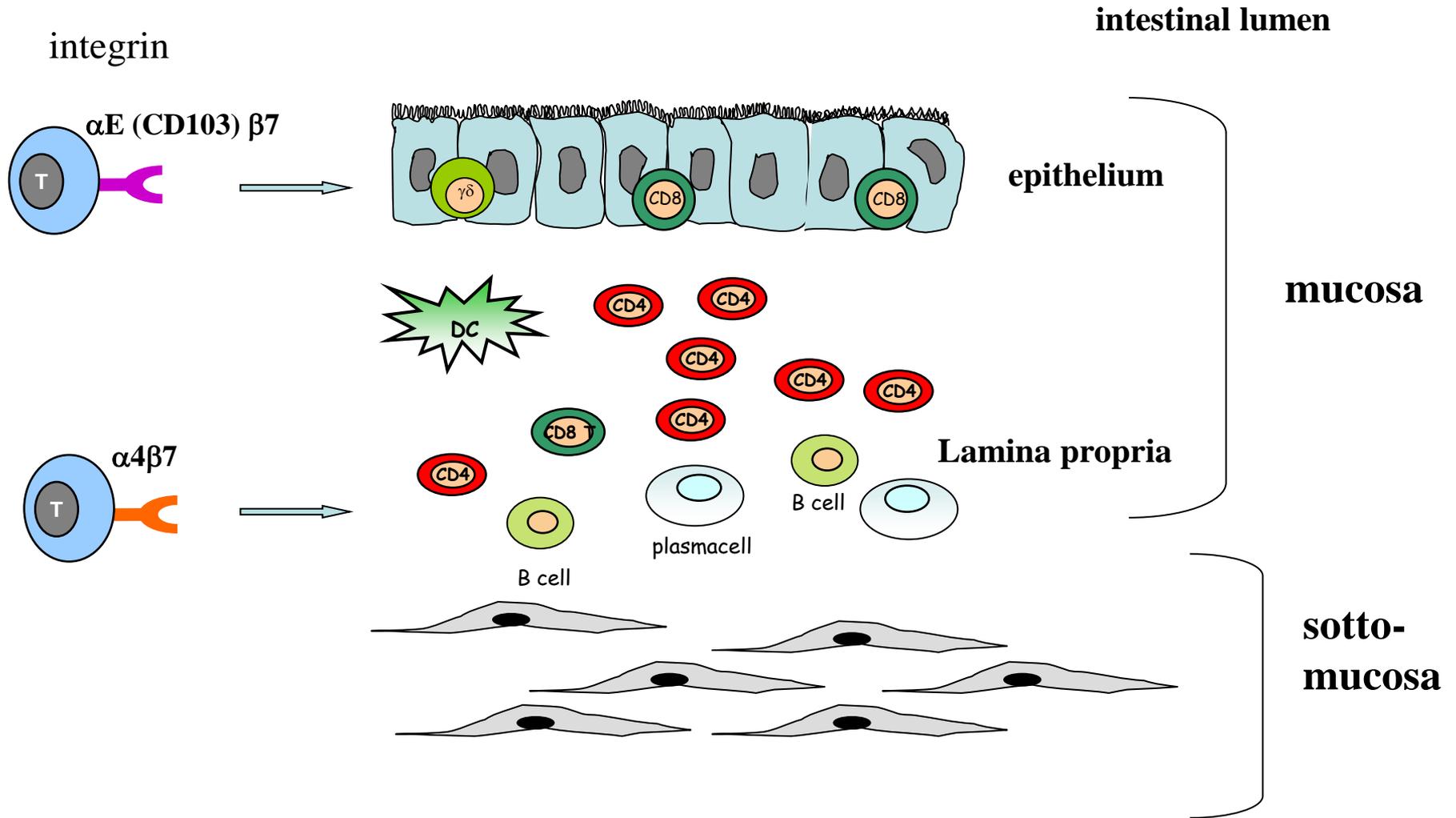
Intestinal uptake and transport of microorganism & food Ag



Homing of mucosal cells



Scattered lymphoid cells



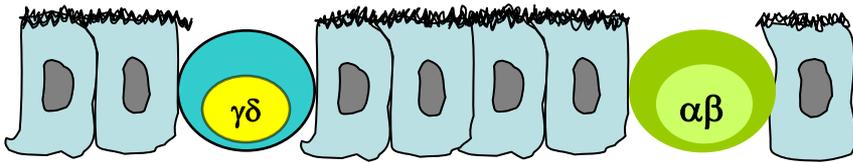
Lamina propria infiltrating lymphocytes (LPL)

- 35% B cells
- 60% T cells (CD3+)
- 80% are CD4+ T cells
- 20% are CD8+ T cells

- Memory/activated cells
- Alfa4beta7 and CCR9
- Interferon- γ , IL-2, IL-17, IL-10, IL-4
- Mostly antigen specific

TCR V β usage reveals oligoclonal populations

Intestinal epithelium infiltrating lymphocytes (IEL)



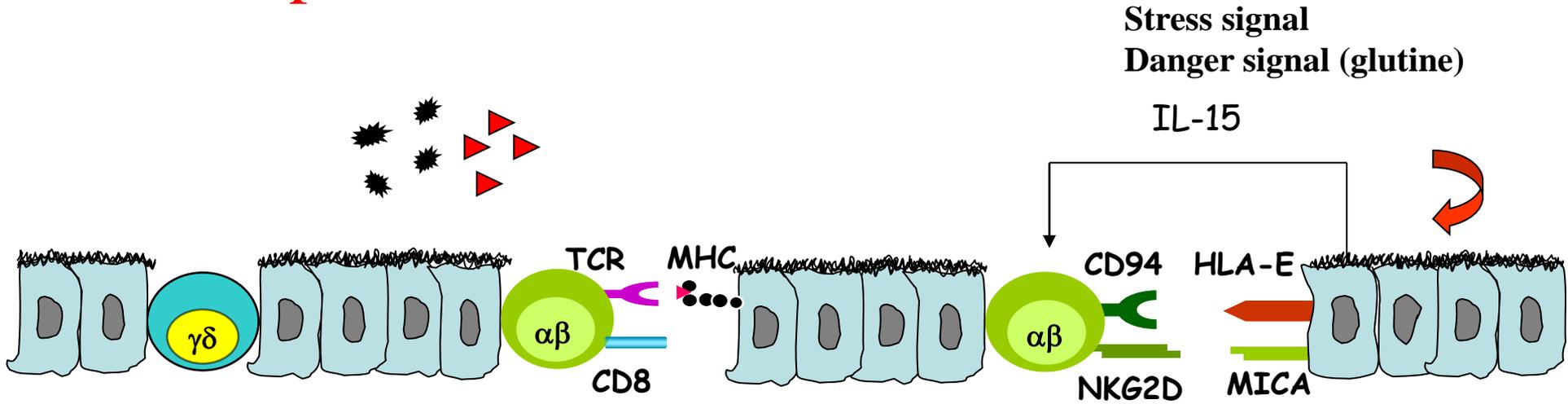
- 1:5 IEL:Epithelial cell
- 90% T cells (CD3+)
- 80% are CD8+ T cells
- 2-15% are CD4+ T cells

- 75% are CD3+ TCR a/b
- 2-30% are CD3+ TCR g/d
- 10% are CD3⁻ CD56+ CD94+ (NK)

- Memory/activated cells
- Large granule containing GRB, perforin
- alphaE (CD103) beta7 integrin
- Interferon-g, IL-5, IL-10, TGFβ

- **Most IEL have an extrathymitic maturation**
- **TCR Vβ usage reveals oligoclonal populations**

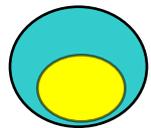
Intraepithelial T cells: the sentinel of intestine?



TCR $\alpha\beta$

- ✓ CD8 $\alpha^+\beta^+$
- ✓ CD8 $\alpha^+\alpha^+$

- ✓ Antigen specific cytotoxicity : virus, parasit
- ✓ No antigen specific cytotoxicity to danger signal

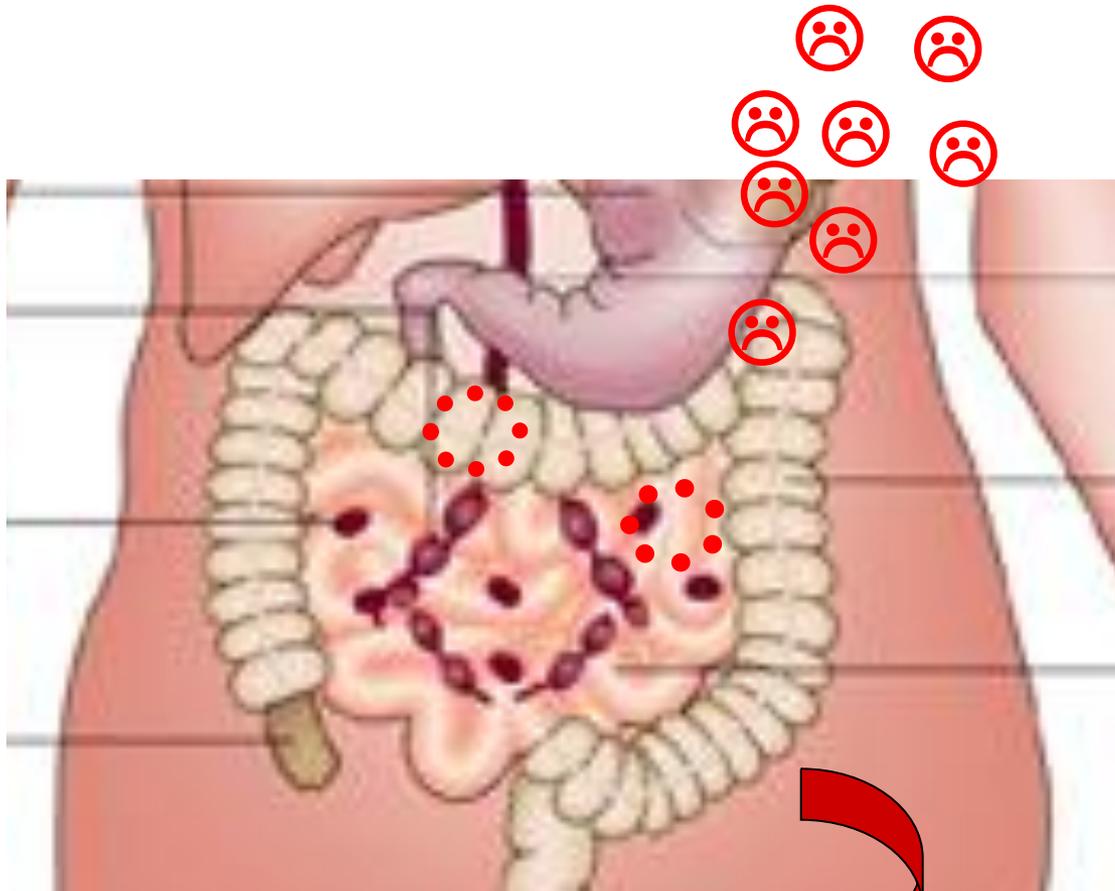


TCR $\gamma\delta$

- ✓ CD8 $\alpha+\beta^+$
- ✓ CD8 $\alpha+\alpha^+$

- ✓ No antigen specific cytotoxicity
- ✓ Regulatory function, TGFbeta, IL-10

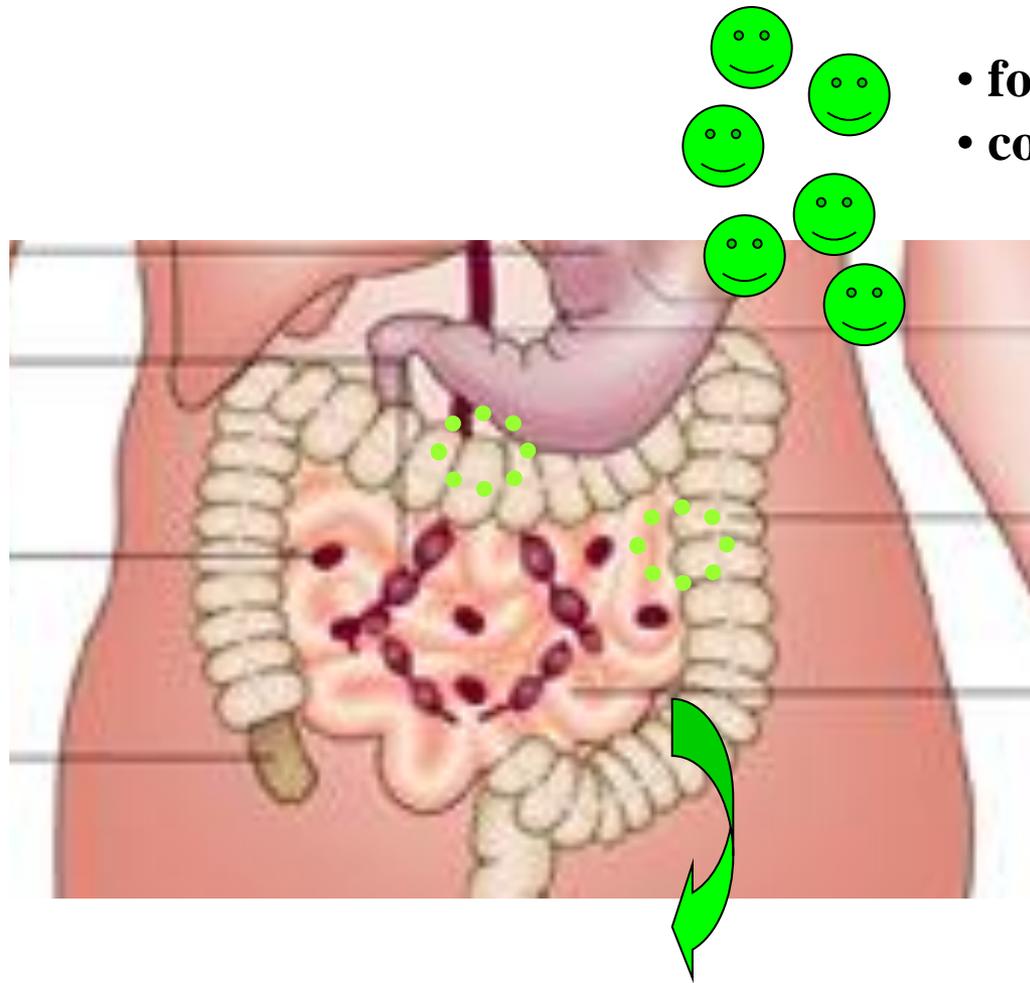
Intestinal lumen encounters PATHOGENIC Antigens



- bacteria
- protozoans
- viruses

ACTIVE IMMUNE RESPONSE of GALT

Intestinal lumen encounters **NON PATHOGENIC** Ags



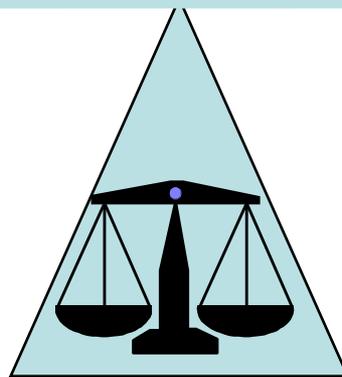
- food antigen
- commensal bacteria

TOLERANCE of GALT
(anergy, T regulatory cells)

Intestinal Mucosal Immune Homeostasis

Immune Response

Immune Regulation

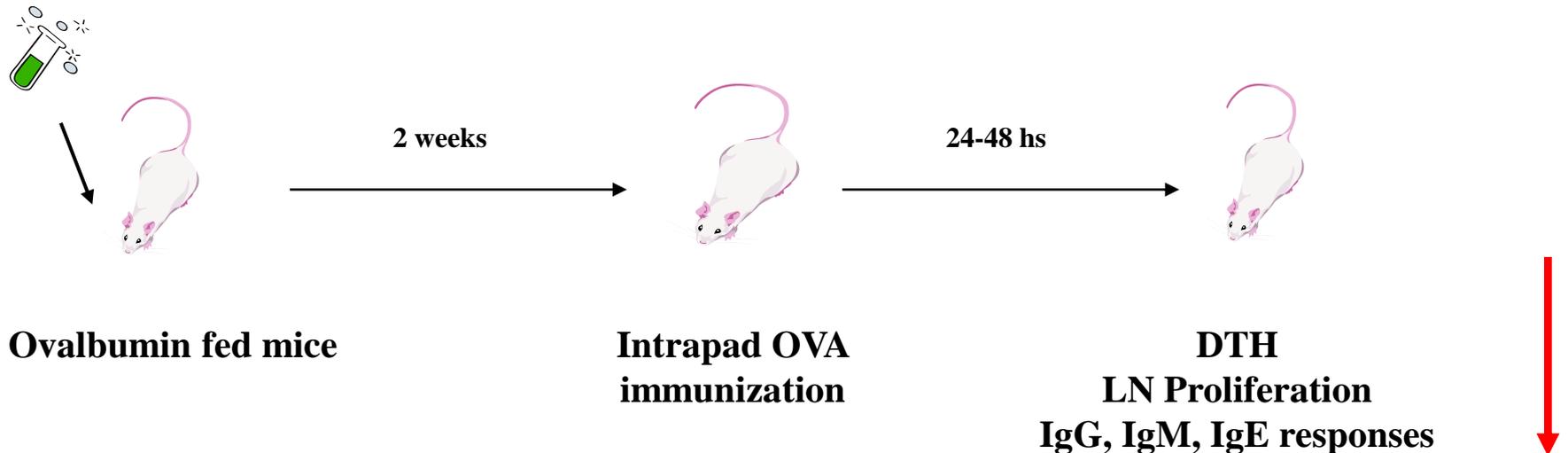


- Pro-inflammatory Iks
- Cytotoxicity
- Innate immunity

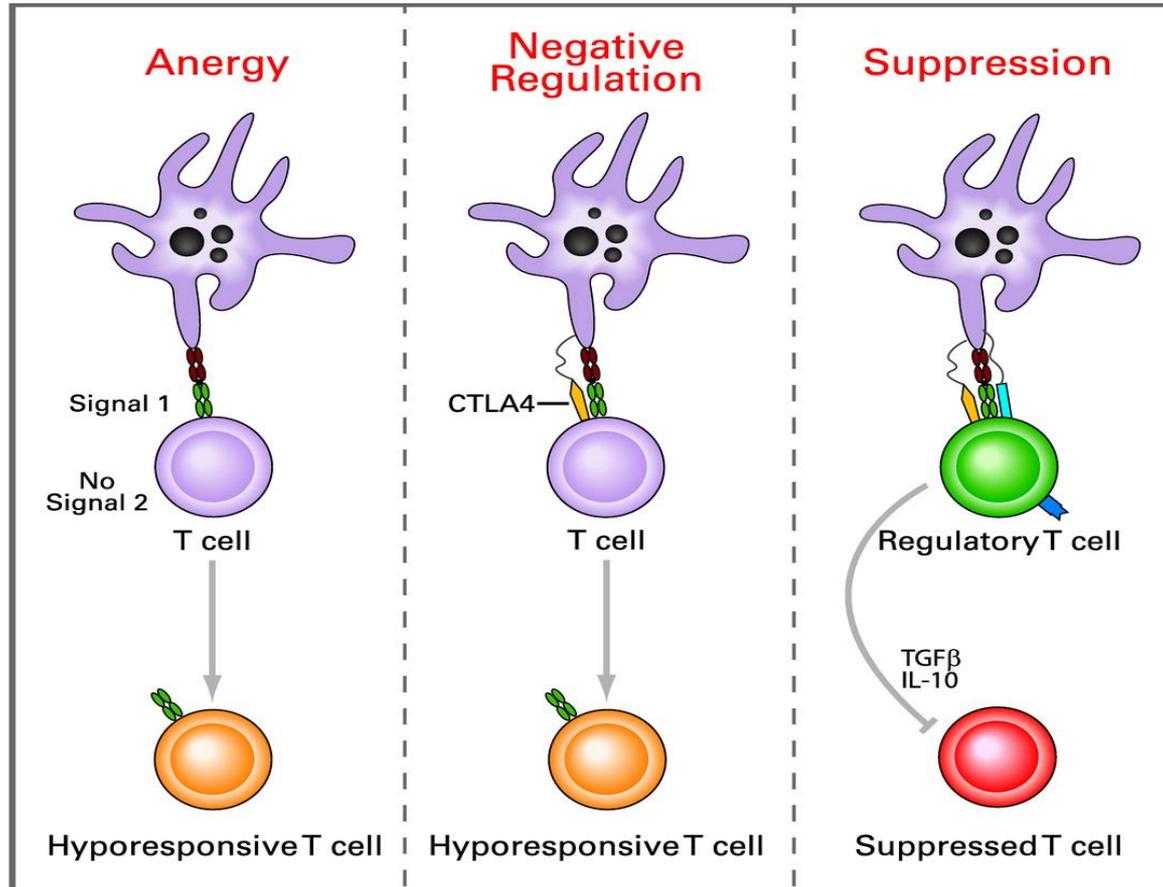
- T cell deletion
- Anergia
- Cellule T regulatorie

Oral tolerance

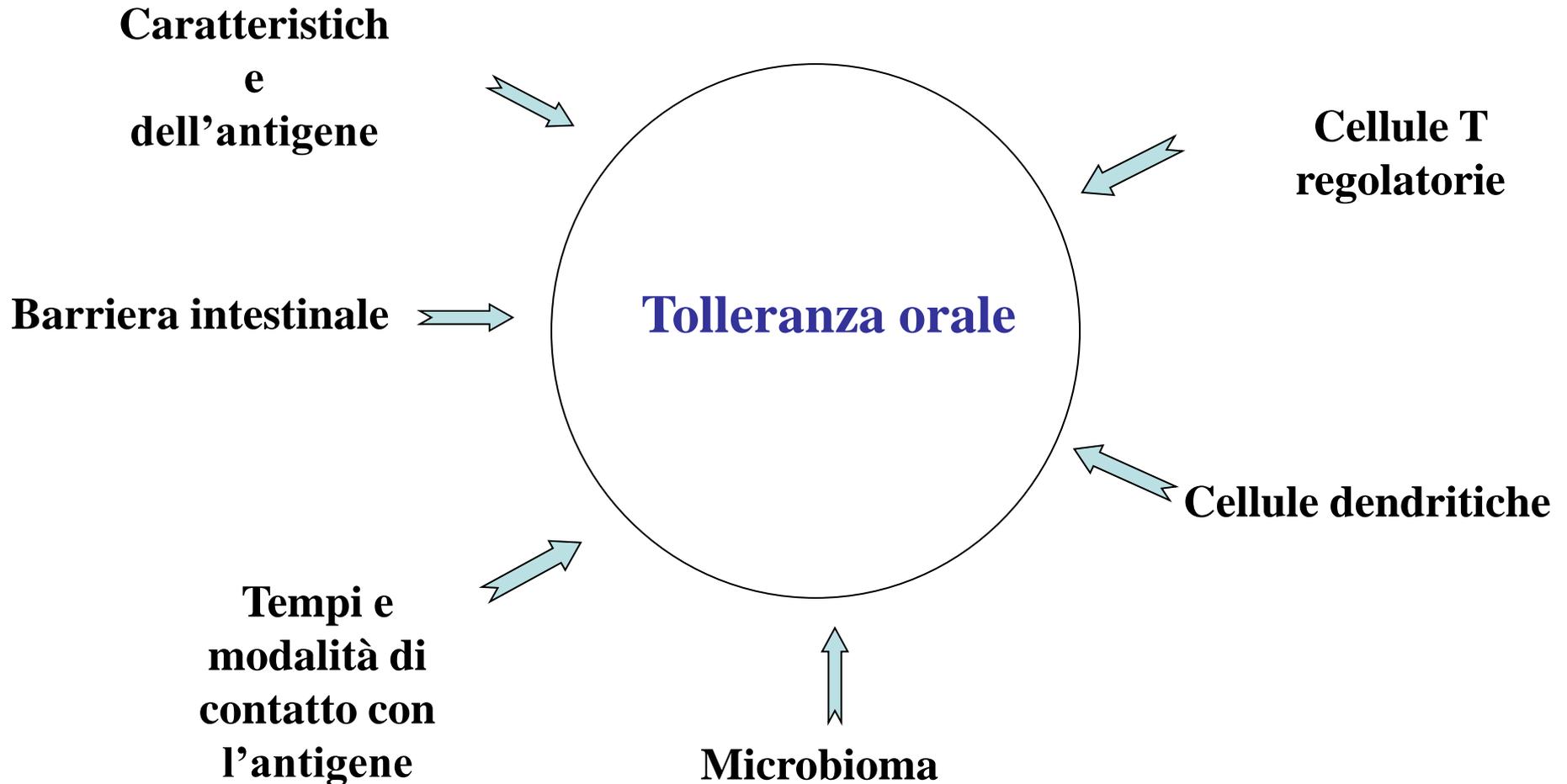
- OT is generally defined as a state of antigen specific unresponsiveness after a prior oral encounter of the antigen
- Pioneering observation of OT in the 70's and 80's in rodents:
An antigen driven peripheral immune tolerance



Meccanismi alla base della tolleranza orale



Fattori che incidono sulla tolleranza orale



Caratteristiche dell'antigene: fattori che promuovono l'allergenicità

- **Peso molecolare < 70 kD**
- **Glicosilazione**
- **Resistenza alla denaturazione chimica o al calore**
- **Presenza di epitopi lineari**
- **Solubilità**

Barriera intestinale

- **Importanza della digestione**

Effetto sensibilizzante degli antiacidi?

- **Oligosaccaridi mucinici e defensine**

- **Aumentata permeabilità?**

Ruolo per le mutazioni della filagrina?

Allergia alimentare post- trapianto (effetto tacrolimus)

- **Capacità tollerogena dell'epitelio**

Induzione di anergia (assenza di molecole costimolatorie)

Azione TSLP (linfopoietina timica stromale): recettore su cellule dendritiche tollerogene e varianti genetiche associate con esofagite eosinofila

Tempi e modalità di contatto con l'antigene

Precoce esposizione: fattore di rischio o favorente la tolleranza?

Aumentata prevalenza di allergia ad arachidi e grano in relazione a ritardata esposizione

Studi in modelli murini

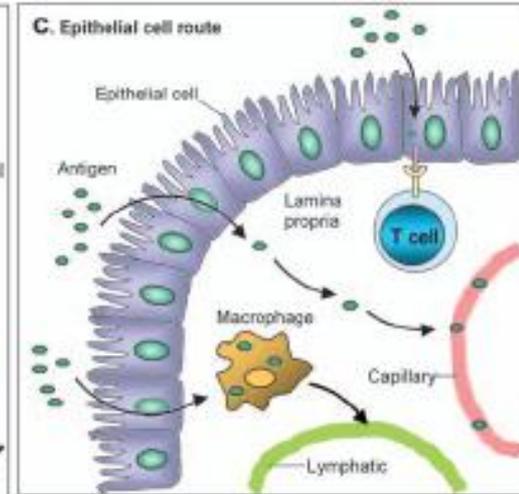
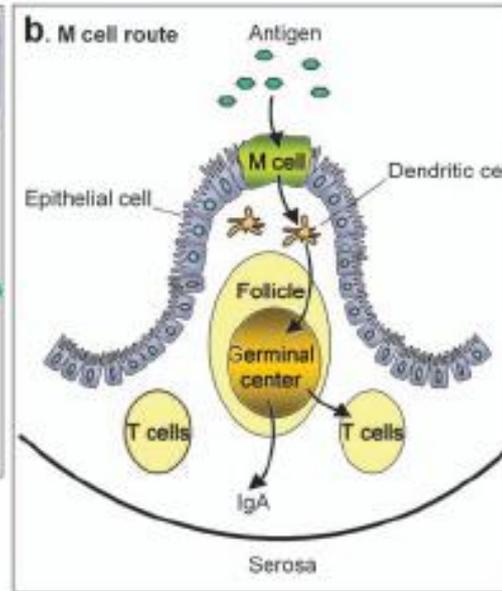
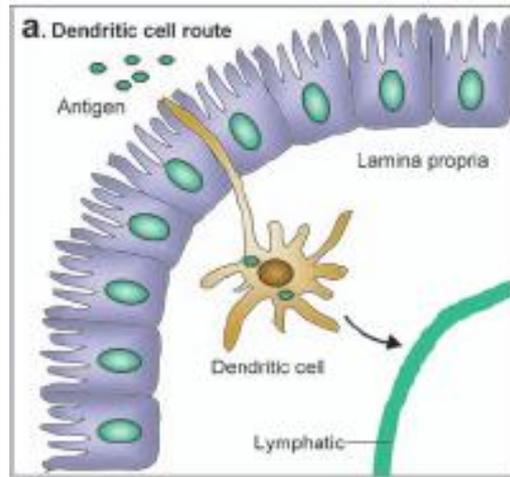
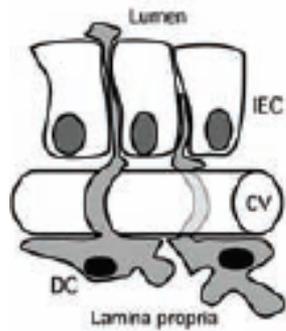
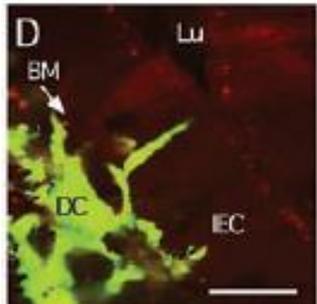
Microbioma

Segnali da recettori dell'immunità innata (TLRs) giocano un ruolo importante in omeostasi, generazione di cellule Tregs e outcome dell'allergia

Specifici prodotti batterici (vedi polisaccaride A del *bacteroides fragilis*) interagiscono con i TLRs e promuovono le Tregs, modulando l'infiammazione in modelli murini di IBD (*Round et al, PNAS 2010; 107:12204*)

Tuttavia, finora risultati deludenti dai trials con probiotici per la prevenzione e il trattamento delle allergie

Localizzazione delle cellule dendritiche



Niess et al. *Science*,
2005, 307, 254-258.

Chehade M & Mayer L. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:3-12

Cellule dendritiche

Step critico per lo sviluppo di tolleranza orale è il passaggio nei linfonodi mesenterici di cellule CD103+ CD11c+

Ruolo cruciale per CD103 (ligando Ecaderina), acido retinoico, indoleamina-2,3diossigenasi, TGFbeta

Acido retinoico induce:

- α 4 β 7 e CCR9**
- Produzione IgA**
- Induzione cellule regolatorie FOXP3 positive**

Cellule T regolatorie

- Treg non convenzionali
 - TCR $\gamma\delta$ IEL
- Treg convenzionali
 - Treg naturali derivate dal timo (CD4+CD25+FOXP3+)
 - Treg inducibili (iTreg cells)
 - Th3 (CD4+TGF β +FOXP3+)
 - Tr1 (CD4+IL-10+FoxP3-)

Evidenze per un ruolo di cellule CD4CD25^{high} Treg

Bambini divenuti tolleranti mostrano, ad una settimana dal challenge, un aumento nel sangue periferico di linfociti CD4⁺ CD25⁺ e una diminuita risposta proliferativa alla beta-lattoglobulina. La deplezione di cellule CD4⁺CD25⁺ provoca un aumento di 5 volte della risposta proliferativa

Evidenze per un ruolo di cellule CD4CD25^{high} Treg

Forma familiare di sindrome IPEX:

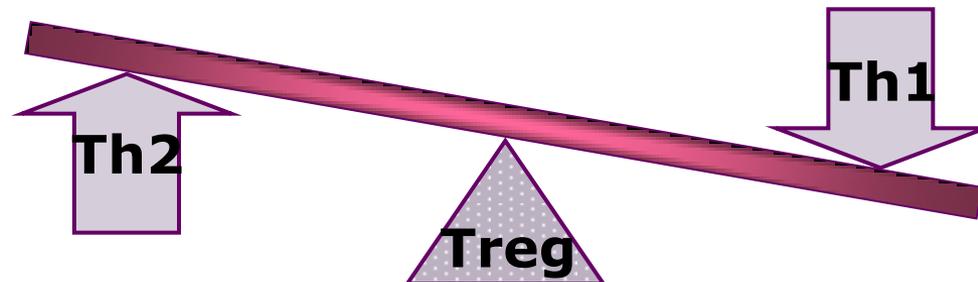
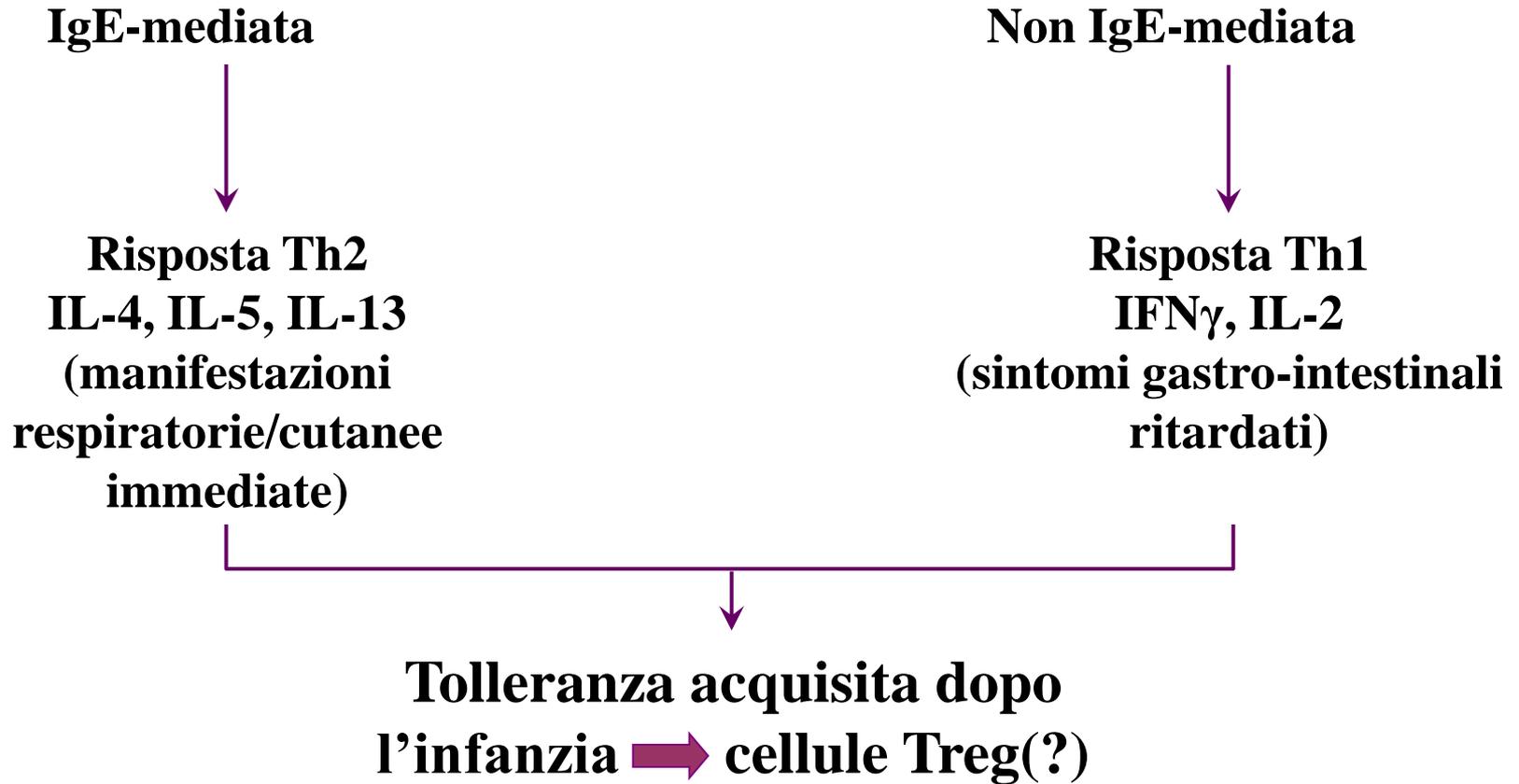
- Severa enteropatia
- Allergia alimentare
- Dermatite atopica
- Iper IgE e eosinofilia

Delezione gene FOXP3, bassi livelli FOXP3 mRNA e quasi assenza di cellule CD4CD25⁺FOXP3⁺

Evidenze per un ruolo di cellule CD4CD25^{high} Treg

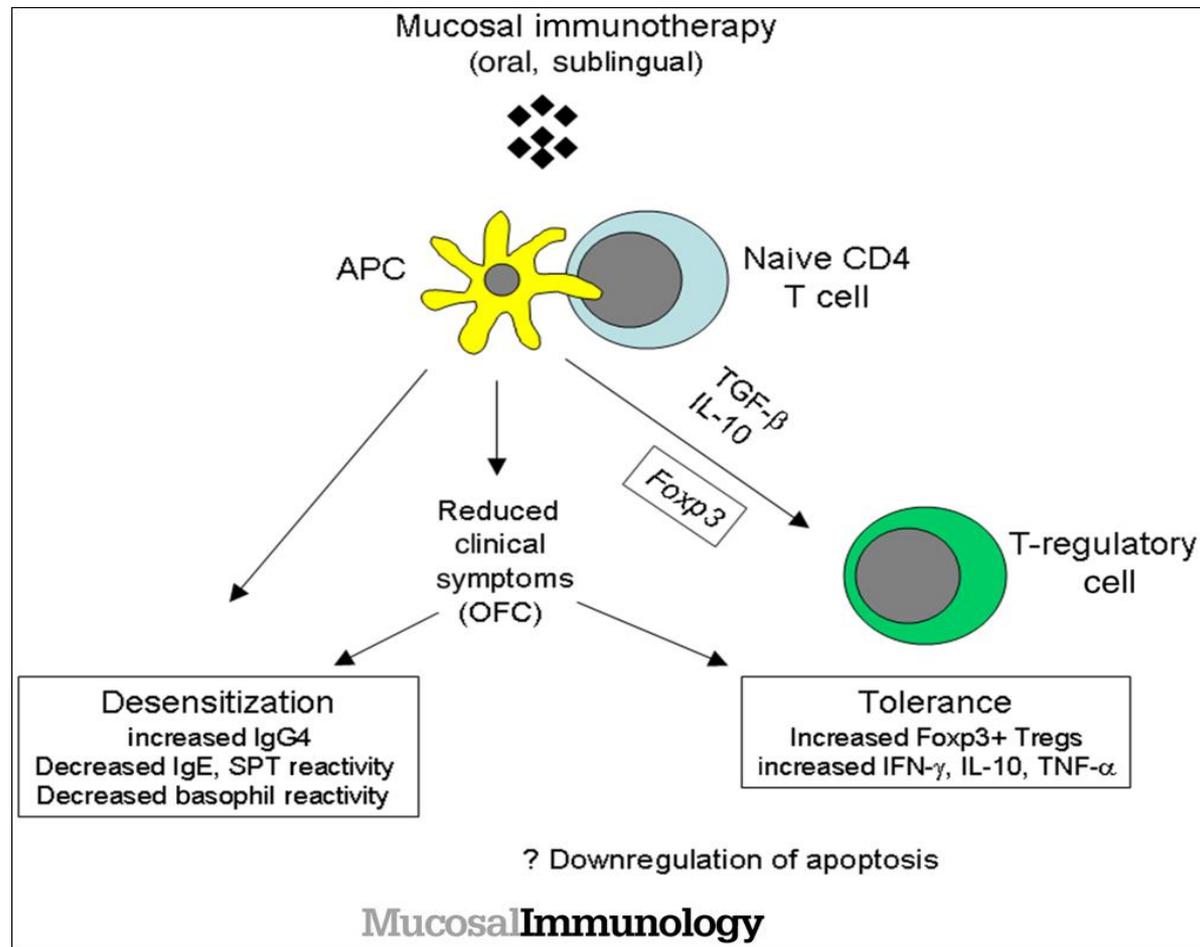
Maggior numero di cellule T regolatorie specifiche per il latte in bambini che tollerano proteine del latte denaturate al calore

Allergia alle proteine del latte vaccino



Strategie terapeutiche

Desensibilizzazione e Tolleranza



Immunoterapia sublinguale (SLIT) e orale (OIT)

Procedura ben tollerata nelle mani di personale esperto in centri specializzati

Alto rischio di reazioni sistemiche: uso ancora non diffuso nella pratica clinica

Necessità di studi controllati

Necessità di standardizzare estratti, protocolli, durata

Densibilizzazione o tolleranza?

Cibi trattati al calore e induzione della tolleranza

80% dei soggetti allergici a latte e uovo tollerano prodotti riscaldati/cotti.

L'ingestione continua di questi induce modifiche immunologiche:

- **diminuito diametro skin tests**
- **diminuita attivazione di basofili**
 - **aumento di IgG4**
- **aumento delle cellule T regolatorie**

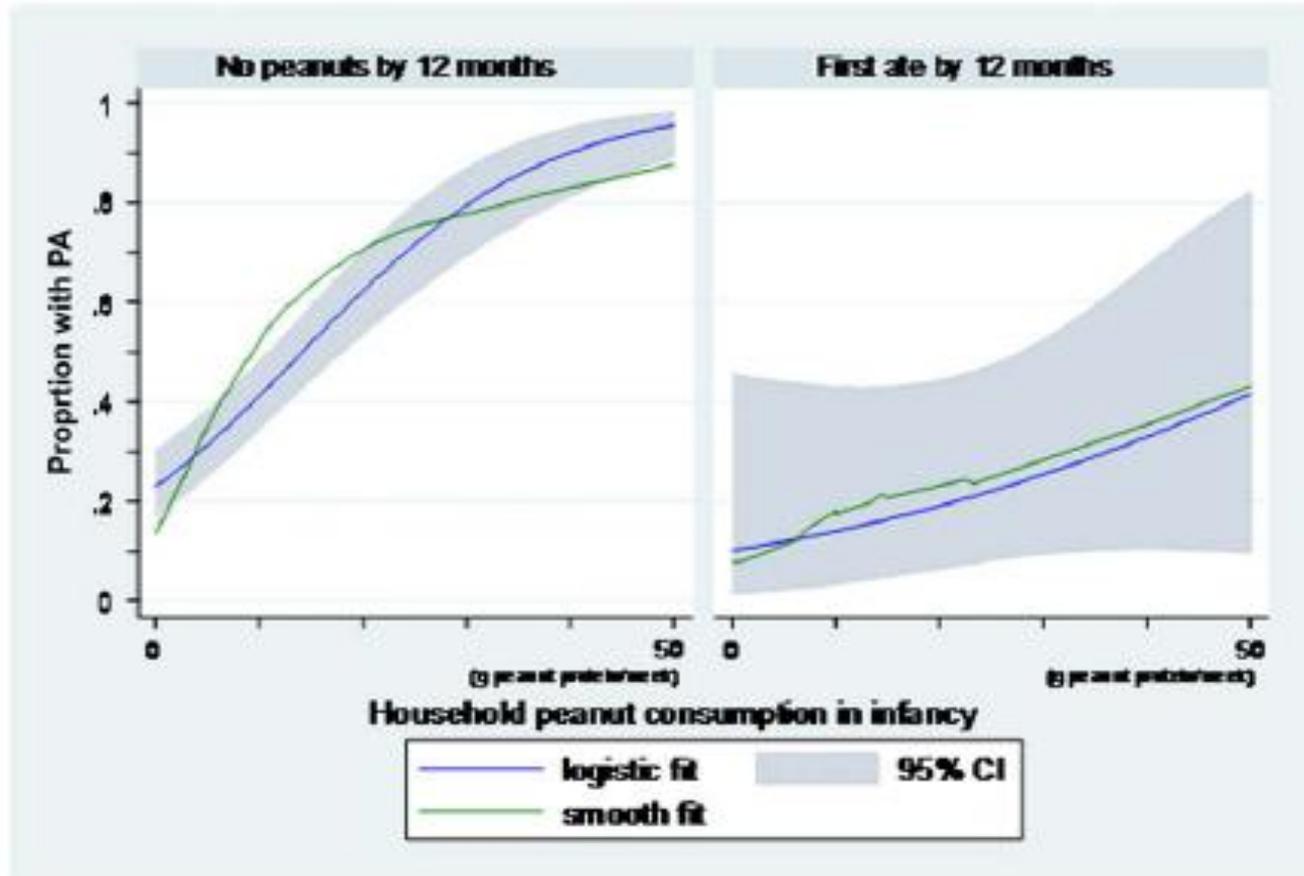
Terapia più sicura e naturale?

Altre strategie

- **Immunoterapia per via parenterale: non sicura, rischio anafilassi**
- **Immunizzazione sottocutanea con allergeni ricombinanti modificati (non in grado di legare le IgE)**
 - **Immunizzazione sottocutanea con plasmidi batterici contenenti allergeni coniugati con sequenze di citosine e guanine non metilate (CpG)**
- **Immunizzazione epicutanea con allergeni legati a strutture batteriche (PAMPs)**
- **Allergeni ingegnerizzati in Ecoli uccisi al calore applicati per via rettale**

Strategie di prevenzione

La somministrazione precoce di piccole quantità favorisce la tolleranza?
L'esempio delle arachidi



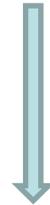
La somministrazione precoce di piccole quantità favorisce la tolleranza?

LEAP (Learning Early About Peanut Allergy)

640 bambini ad alto rischio (eczema o allergia all'uovo: rischio del 20% di sviluppare allergia alle arachidi)

Prima dei tre anni di vita: esclusione o 6 grammi di proteine di arachidi per settimana

Valutazione clinica, test allergologici e studi immunologici



Valutazione clinica, test allergologici e studi immunologici

Valutazione della prevalenza dell'allergia a 5 anni di età

Prevenzione della malattia celiaca in bambini a rischio

PREVENT-CD – 36383 – FP6



Linee guida NIAID, USA

**Non rimandare l'introduzione dei solidi oltre il 4° - 6° mese
(vale anche per alimenti potenzialmente allergenici)**

JACI 2010; 126 S1-S58

Linee guida ESPGHAN

“Avoidance or delayed introduction of potentially allergenic foods, such as fish and eggs, has not been convincingly shown to reduce allergies, either in infants considered at risk for the development of allergy or in those not considered to be at risk”

JPGN 2008; 46:99–110

Il futuro

- Comprensione dei meccanismi alla base della tolleranza
- Terapie basate sulla reinduzione della tolleranza orale
- Prevenzione basata sui tempi e le modalità di introduzione dei solidi nel primo anno di vita, ma anche su interventi attivi (es. sul microbioma)

Reazioni avverse ad alimenti hanno raggiunto proporzioni “epidemiche”

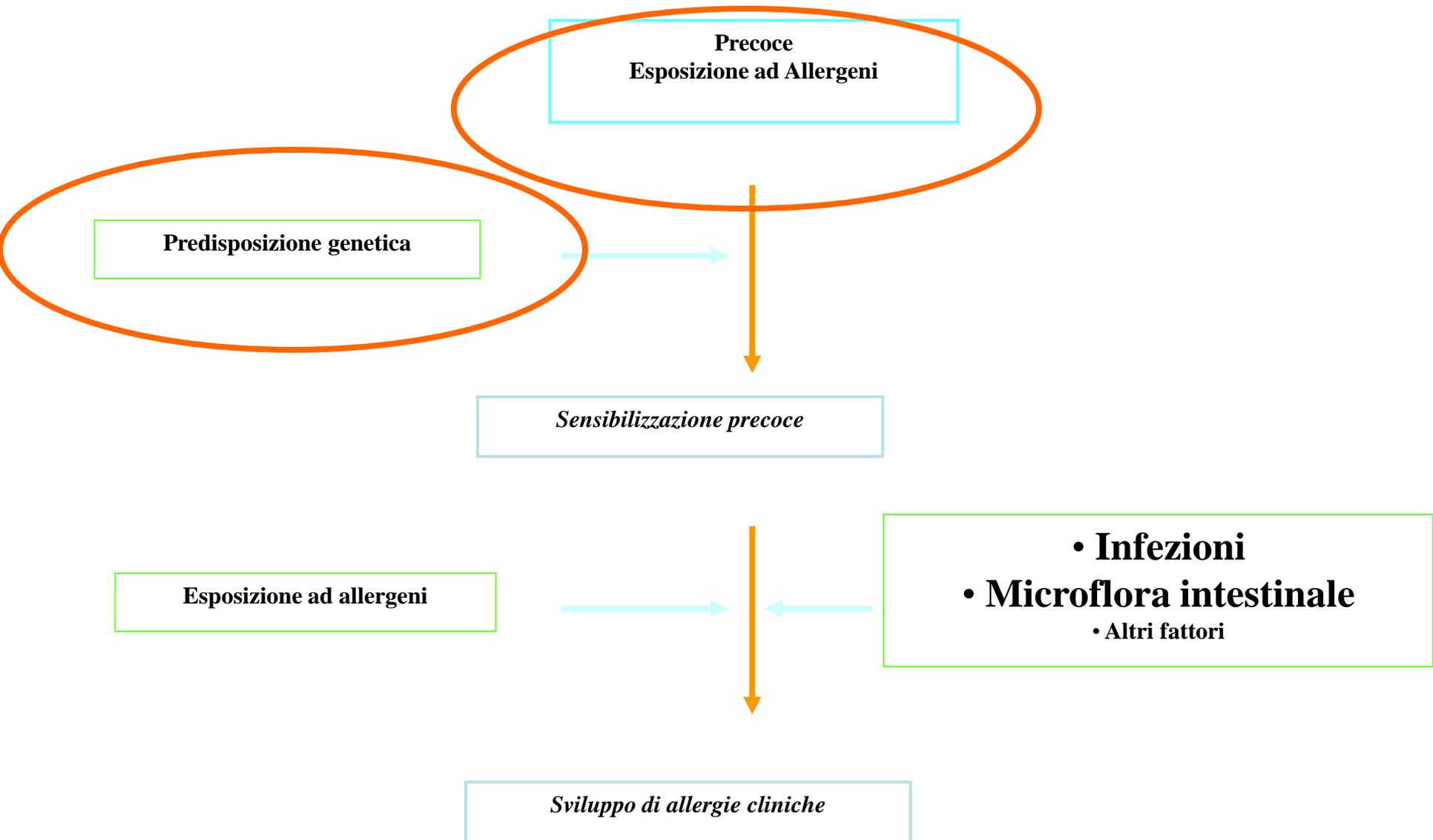
Una prevenzione primaria (no
sensibilizzazione e induzione di tolleranza) e'
oggi possibile

Strategie di prevenzione basate sulla dieta per:

Allergie alimentari

Malattia celiaca

Meccanismo di sviluppo delle allergie



Studi sulla prevenzione dell'allergia alimentare

Requisiti richiesti

- Disegno prospettico
- Criteri di inclusione ben definiti (popolazione target, definizione dell' "alto rischio")
- Outcomes predefiniti (sintomi)
- Sufficiente follow-up
- Appropriata grandezza del campione

Per gli studi di intervento:

- Disegno doppio cieco
- "Random allocation"
- Documentazione della compliance

Prevenzione delle malattie allergiche

Studi osservazionali

Tre metaanalisi hanno dimostrato un effetto protettivo dell'allattamento esclusivo al seno durante i primi tre mesi di vita su:

- Eczema atopico
- Asma
- Rinite allergica?

L'effetto è maggiore nel gruppo ad alto rischio di atopia

L'introduzione di cibi solidi prima dei 4 mesi è associata con più alto rischio di eczema atopico fino all'età di 10 anni

Prevenzione delle malattie allergiche

Studi di intervento

- Diete di esclusione in gravidanza e in corso di allattamento al seno: no evidenza di protezione
- Protezione conferita dall'allattamento al seno nei confronti di APLV e dermatite atopica per i primi 4 anni di vita (ma non random allocation!)

Quale definizione per l'alto rischio?

- Familiari di primo grado con malattie allergiche (definizione di malattia allergica)

Diagnosi (autodiagnosi o diagnosi fatta da un medico?)

Confermata da test allergologici?

- Singola eredità

Un genitore o un fratello?

Un genitore e/o uno o più fratelli?

- Doppia eredità

Entrambi i genitori

Un genitore e un fratello

- Ereditarietà allergica combinata con elevati valori di IgE cordonali (ma quale cut-off?)

Prevenzione delle malattie allergiche

Studi di intervento basati su formule

Soia

Dati contrastanti

eHF (ma sempre anche ritardata introduzione di cibi solidi!)

Diminuita incidenza di allergia alimentare (max APLV) e DA fino all'età di 7 anni

pHF

3 su 4 studi di confronto eHF vs pHF mostrano maggiore efficacia delle prime

pHF efficaci nella prevenzione di DA in bambini con storia familiare

Quanto protrarre nel tempo l'intervento?

- Efficacia dimostrata per i primi 4-6 mesi di vita
- No vantaggio addizionale se intervento protratto fino ai 12-24 mesi di vita
- No significativa efficacia se intervento realizzato dopo il 6° mese di vita in bambini allattati esclusivamente al seno fino a quell'età

Raccomandazioni dietetiche basate sulle conoscenze disponibili

Per tutti i bambini:

- No diete speciali durante gravidanza e allattamento
- Allattamento esclusivo al seno preferibile fino a 6, comunque fino a 4 mesi di vita
- Introduzione cibi solidi preferibile dopo i 6 mesi, in ogni caso dopo i 4 mesi di vita

Per coloro ad “alto rischio”:

- Se una supplementazione e' necessaria, raccomandata una formula estensivamente idrolizzata per i primi 4 mesi; successivamente vanno alimentati come gli altri bambini.