

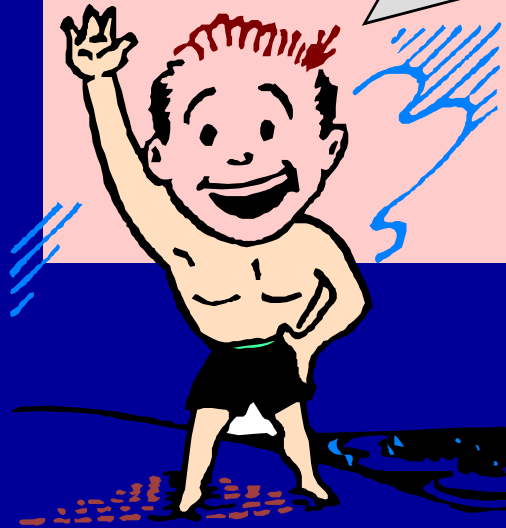


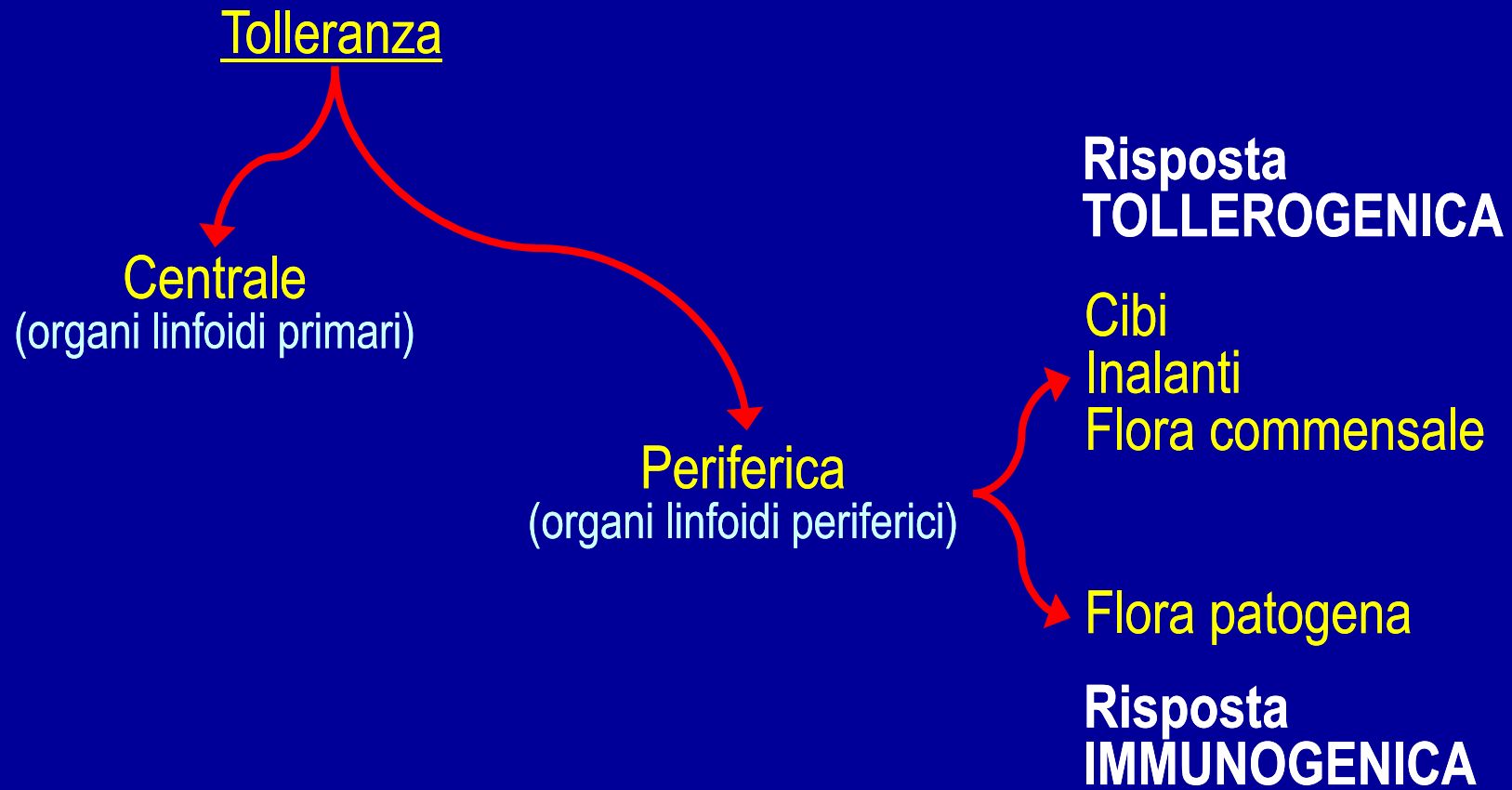
Paolo Meglio

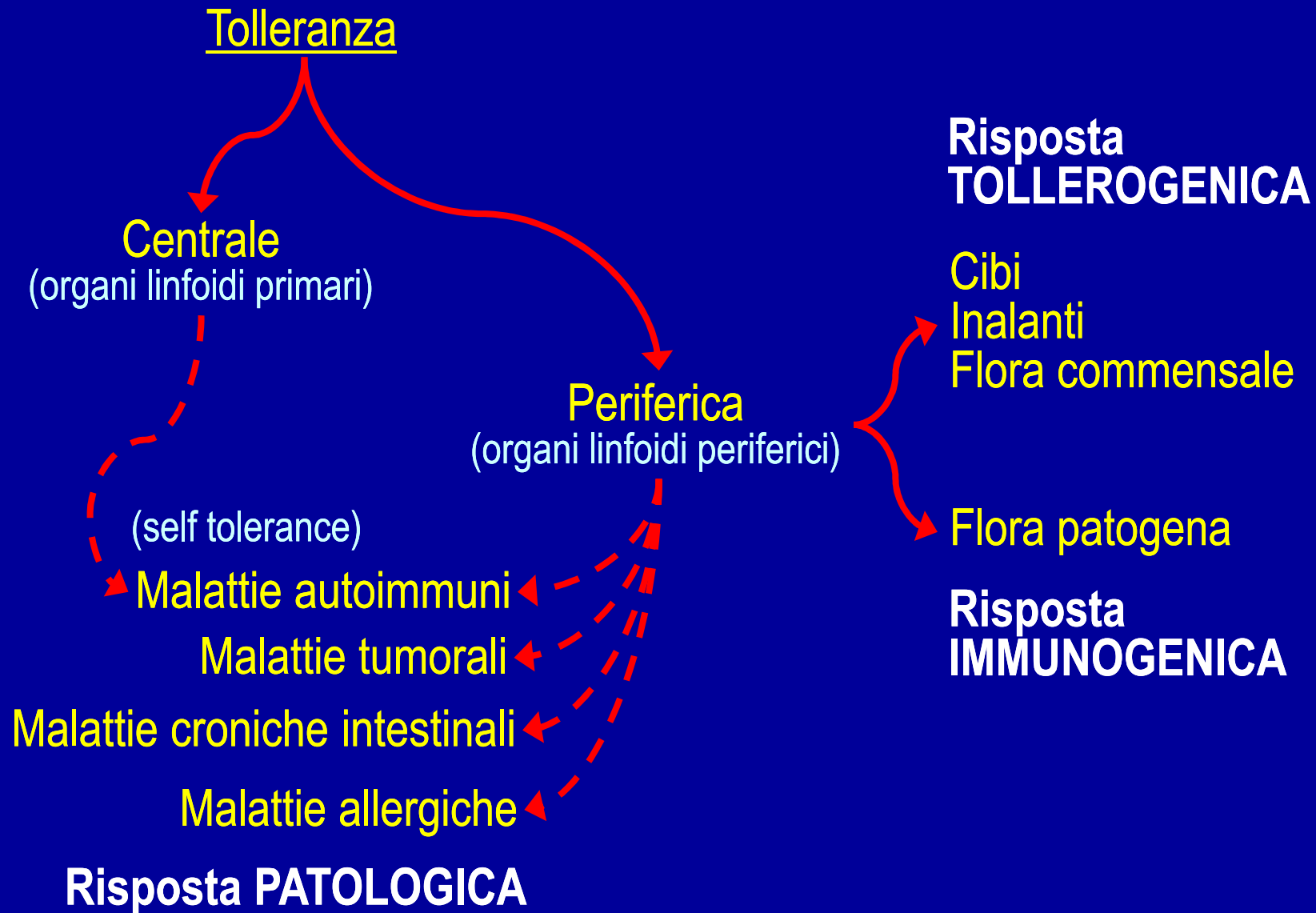
Perché tolleriamo e
ri-tolleriamo gli alimenti

Siamo nati per tollerare,
tolleriamo ancor prima di
nascere...

Ma dobbiamo anche
difenderci ...





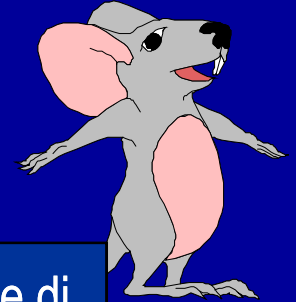


Bergerot e al. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:4610

A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes

Ploix et al. Diabetes 1999;48:2150

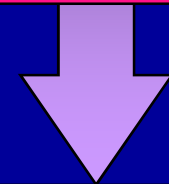
Oral administration of cholera toxin B-insulin conjugates protects NOD mice from autoimmune diabetes by inducing CD4+ regulatory T-cells.



L'effetto **protettivo-preventivo** è trasferibile con le cell T CD4+

Somministrazione orale di Insulina /CTB

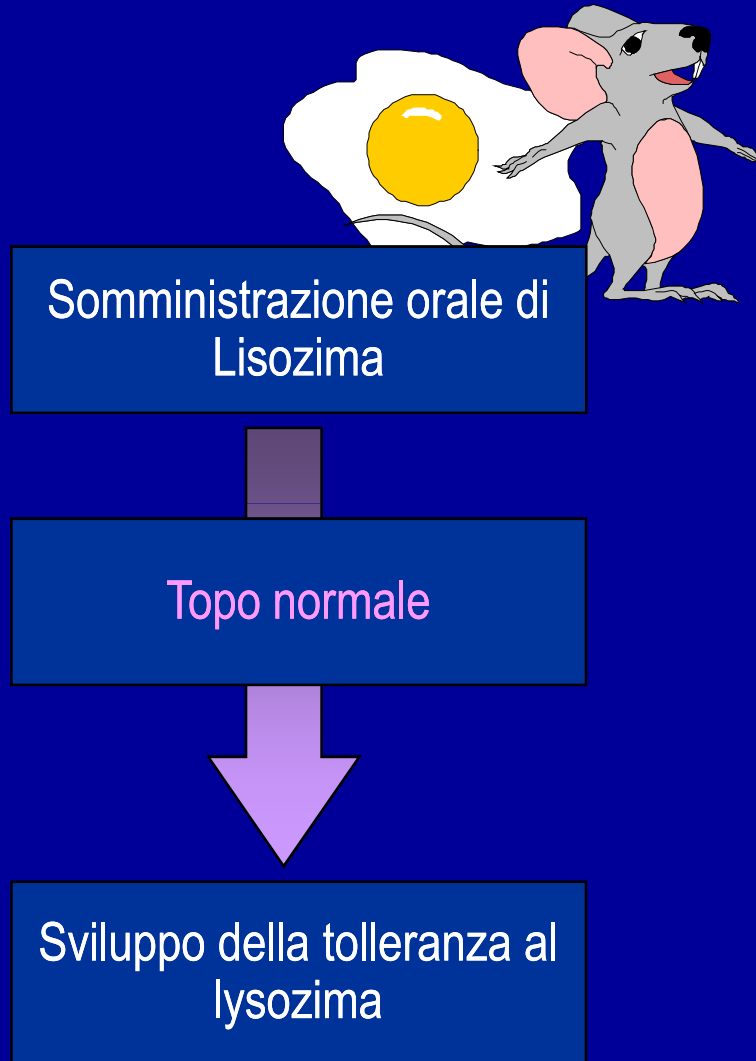
Non-Obese Diabetic (NOD)



Soppressione dello sviluppo di diabete I

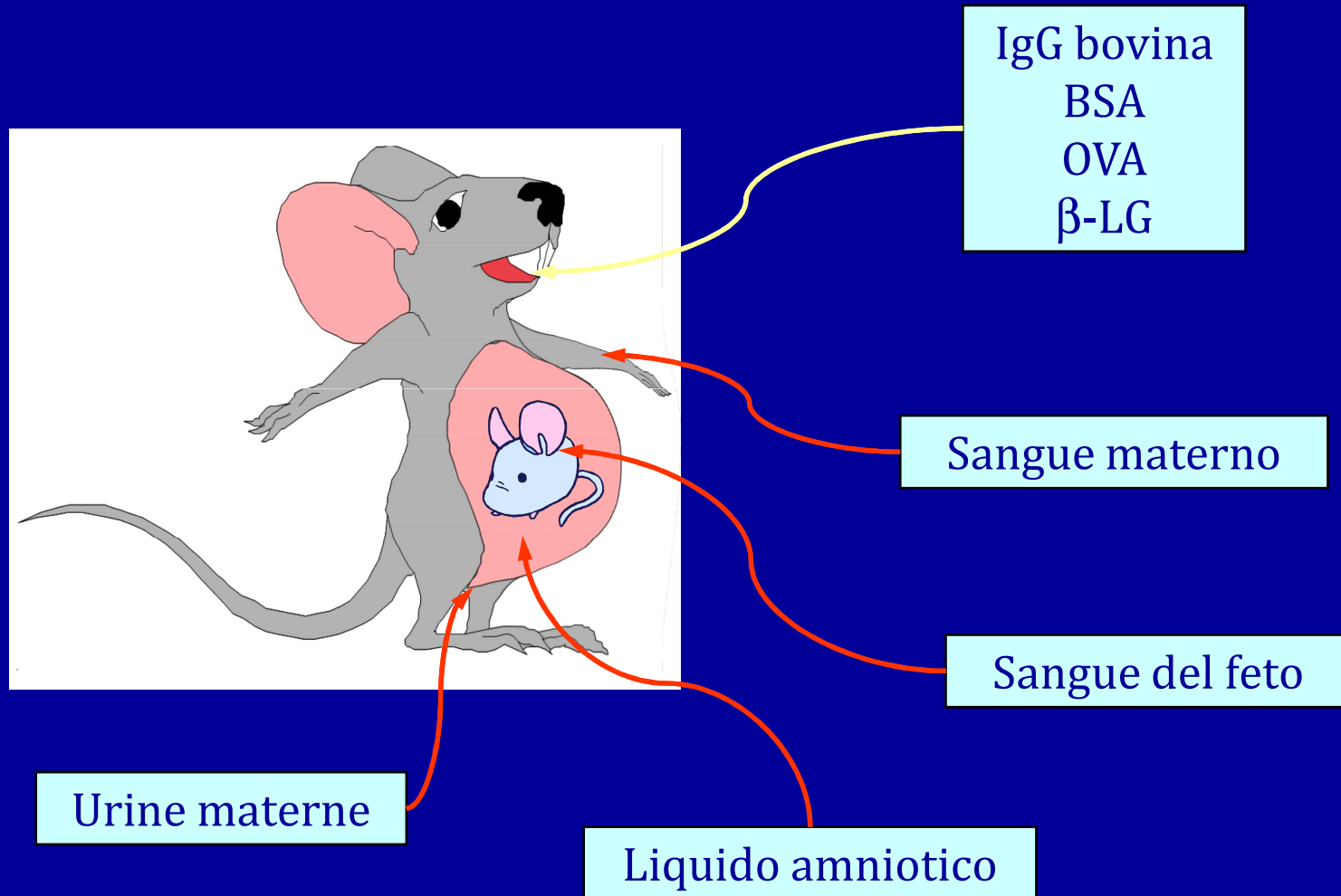
Friedman & Weiner. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:6688
Induction of anergy or active suppression following
oral tolerance is determined by antigen dosage

Come per le proteine
endogene, anche
l'assunzione delle
esogene induce la
TOLLERANZA



Dahl et al. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1984; 77:199

The passage of orally fed proteins from mother to foetus in the rat



Passaggio trans-amniotico
(contatto mucoso)



- Inizio deglutizione a 10 wk

Passaggio trans-placentare
(via ematica)

Passaggio: tutte le proteine,
allergeniche e non.

Soggetti: potenzialmente
allergici e non.

Fenomeno naturale e normale.

Jones et al. *JACI* 2001; 108:235

Costimulatory molecules in the developing human gastrointestinal tract - A pathway for fetal allergen priming



Neonato

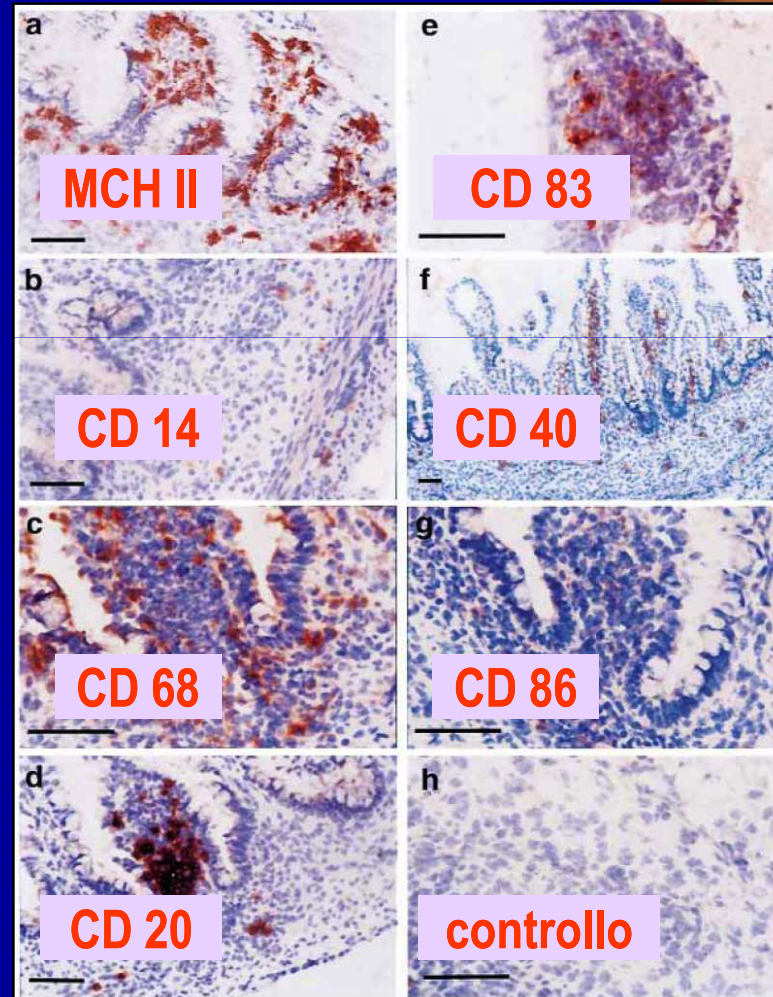
- Reattività T-cell Ag specifica per **allergeni**, autoantigeni, parassiti
- Dimostrabile dalla 23 EG

Presente da
11a wk

Co-recettore
per i TLRs

Monociti,
Macrofagi &
precursori DCs

B cell



Mature DCs
(APCs)

Presente su APCs
(attivazione)

ACPs (segnale
costimolatorio,
fam.B7)

Warner. *ADC* 2004; 89:97

The early life origins of asthma and related allergic disorders

L'assetto Th2
impedirebbe
l'aborto

Il tutto avviene in
un ambiente
GERM FREE

Maternal TH-1↓, TH-2↑
No fetal rejection

Circulating allergens and
maternal Ig-E to amniotic fluid

Placenta (II)

Epitelio amniotico

IL-4, 13

Th2

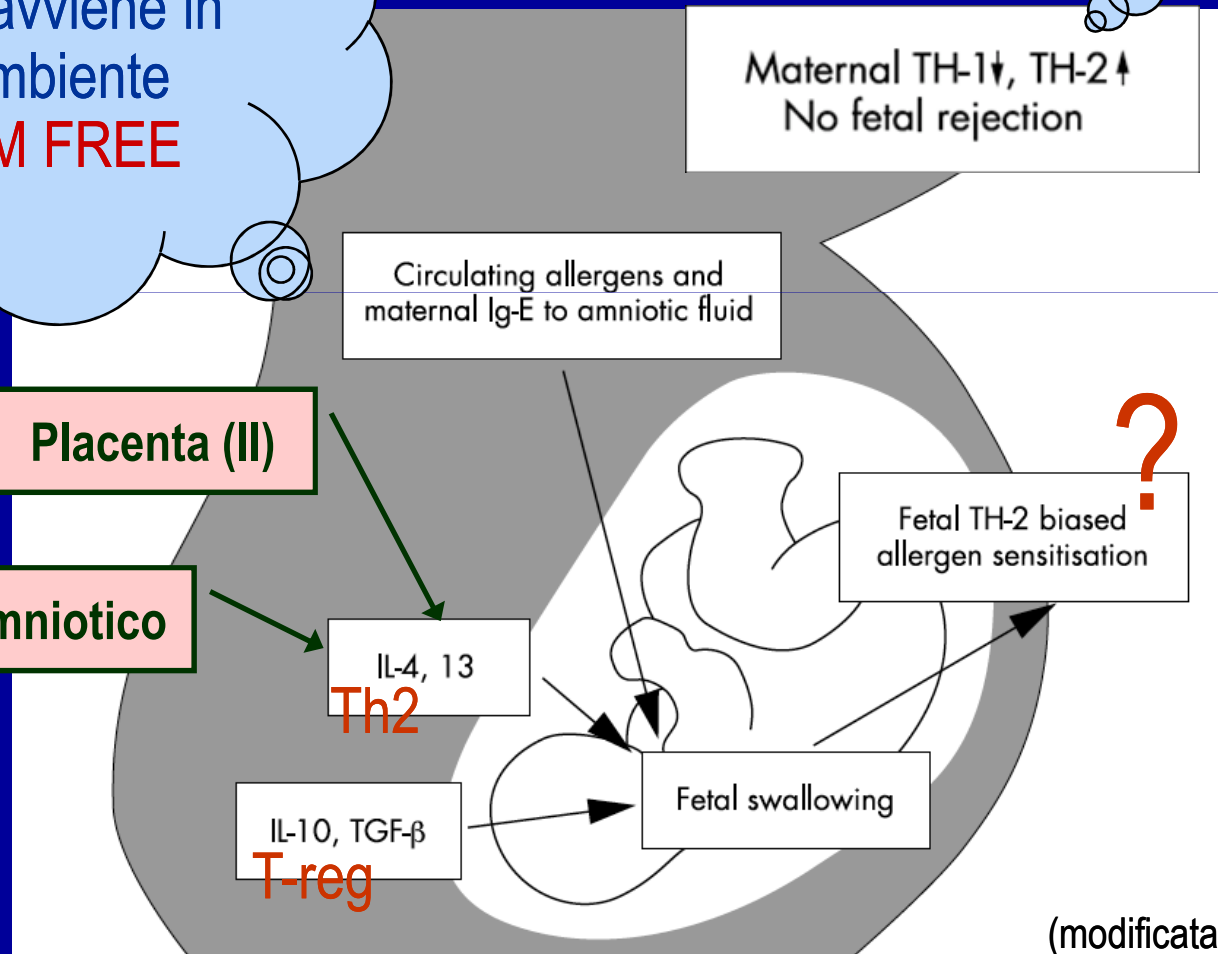
IL-10, TGF-β

T-reg

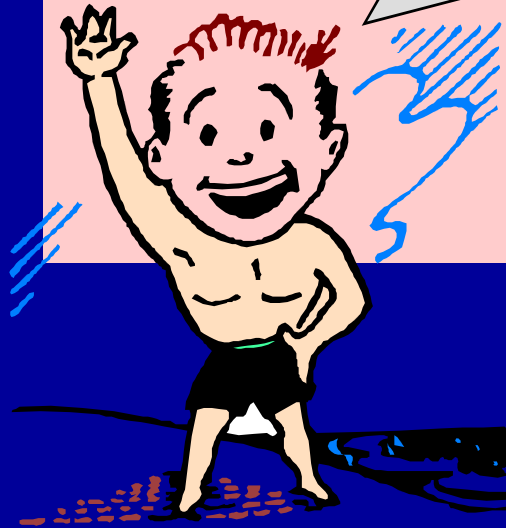
Fetal TH-2 biased
allergen sensitisation ?

Fetal swallowing

(modificata)



L'accesso delle proteine intere
al GALT E' NECESSARIO ai fini
della tolleranza ...

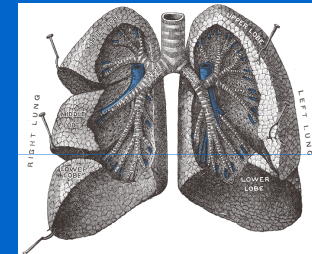


Le superficie

■ Pelle = 1,5-2mq



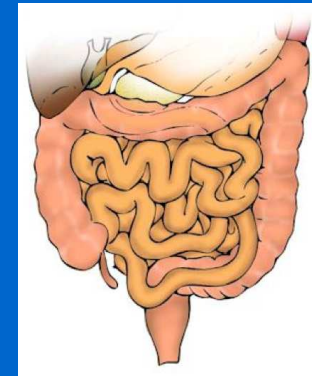
Polmone = 60-70mq



Quantità TOTALE:
~ 30.000 Kg/vita

PROTEINE:
4.500 Kg/vita

Intestino = 300-400mq



Meccanismi ASPECIFICI


LISOZIMA
LATTOFERRINA
PEROSSIDASI
ACIDITÀ GASTRICA

RIVESTIMENTO EPITELIALE
CELLULE CALICIFORMI e MUCO (barriera fisica)
SECREZIONE PANCREATICA
SECREZIONE BILIARE

CHIUSURA INTESTINALE (e tight junctions)
PERISTALSI

MICROFLORA INTESTINALE

NEUTROFILI

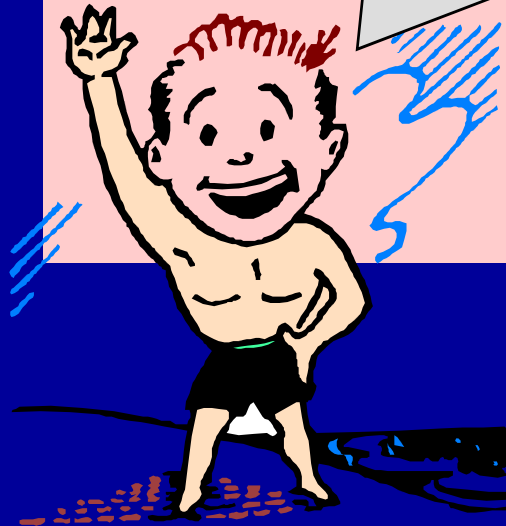


Tutto ciò limita,
ma non impedisce
l'accesso al SI

MANGIARE non è solo DIGERIRE

Ogni volta che mangiamo
operiamo un **atto**
IMMUNOLOGICO

Ad ogni pasto il nostro organismo
sceglie, con una risposta **ATTIVA**,
cosa tollerare e cosa non

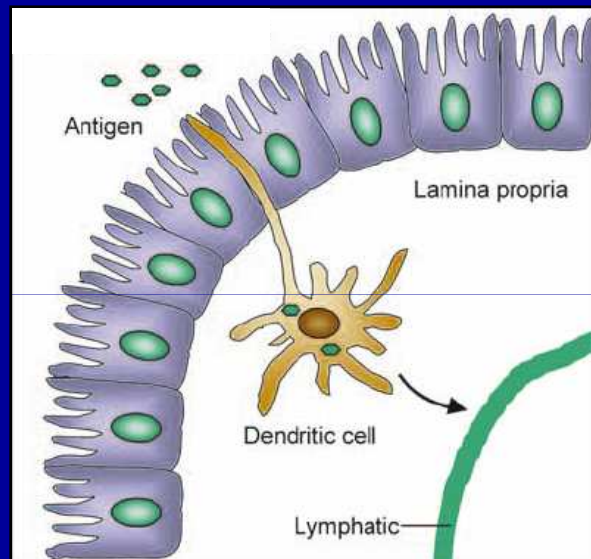


Chehade. JACI 2005; 115:3

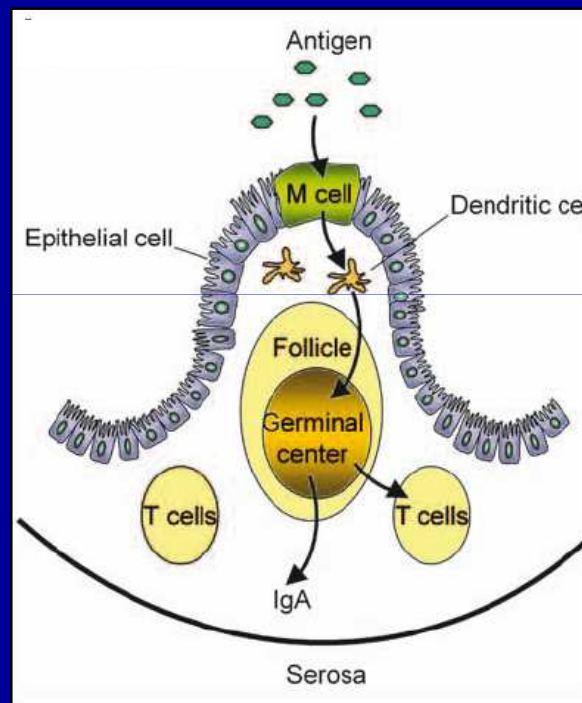
Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities

La "cattura" dell'Antigene

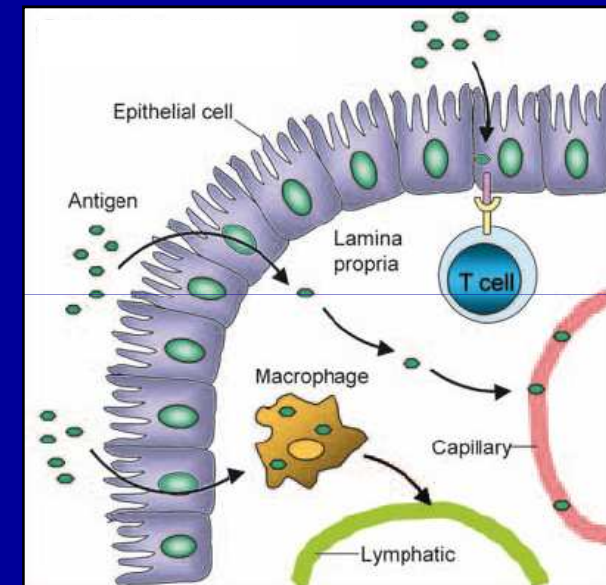
DCs



M cell



Epithelial cell



Di fatto sono tutte
ANTIGEN PRESENTING CELLS

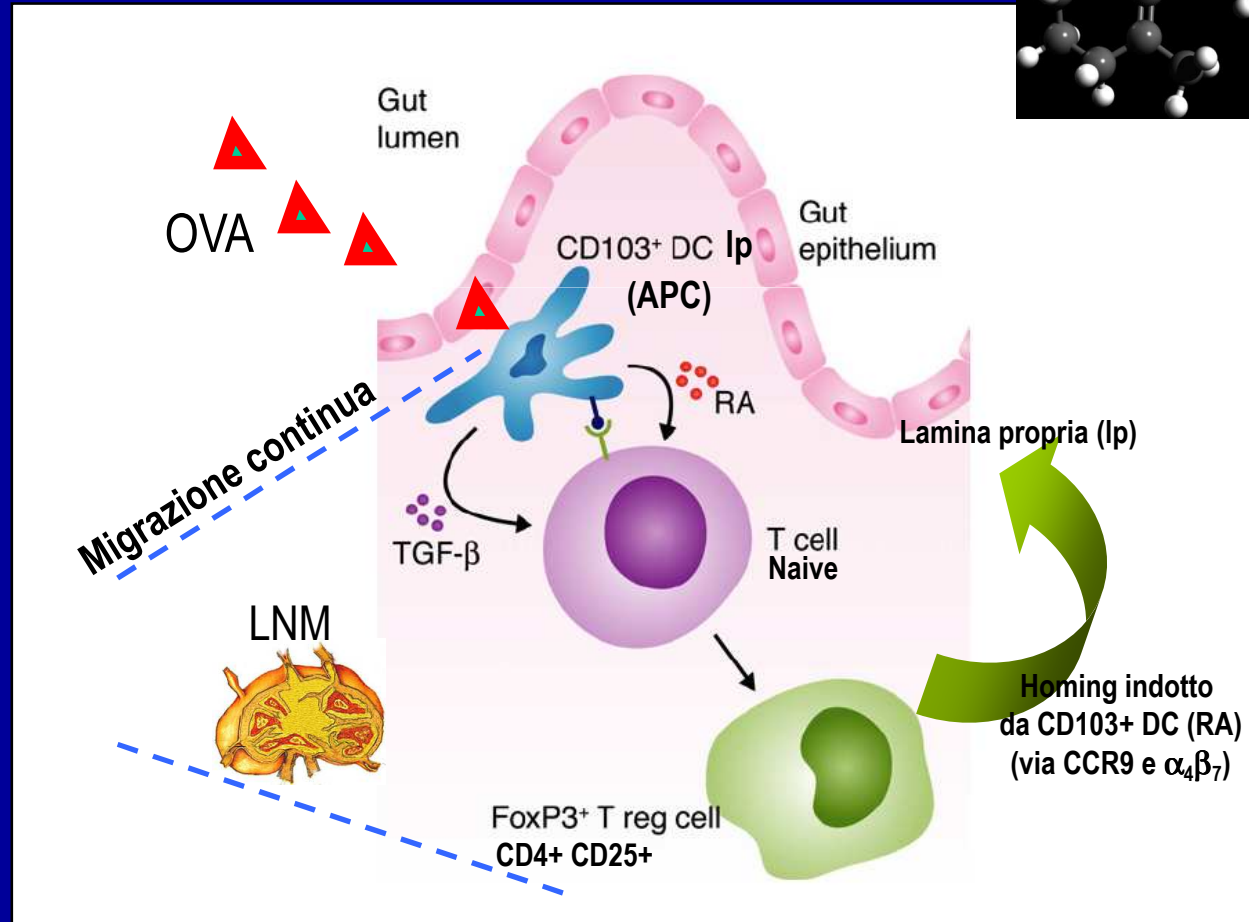
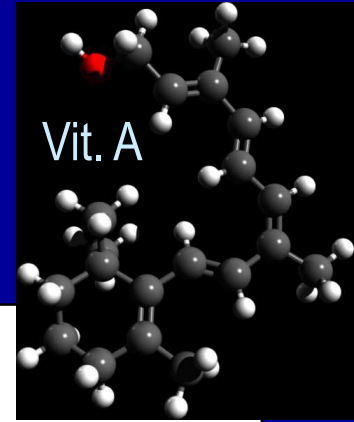
Coombes et al. *JEM* 2007; 204:1757

A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β – and retinoic acid – dependent mechanism

Von Boehmer. *JEM* 2007; 204:1737

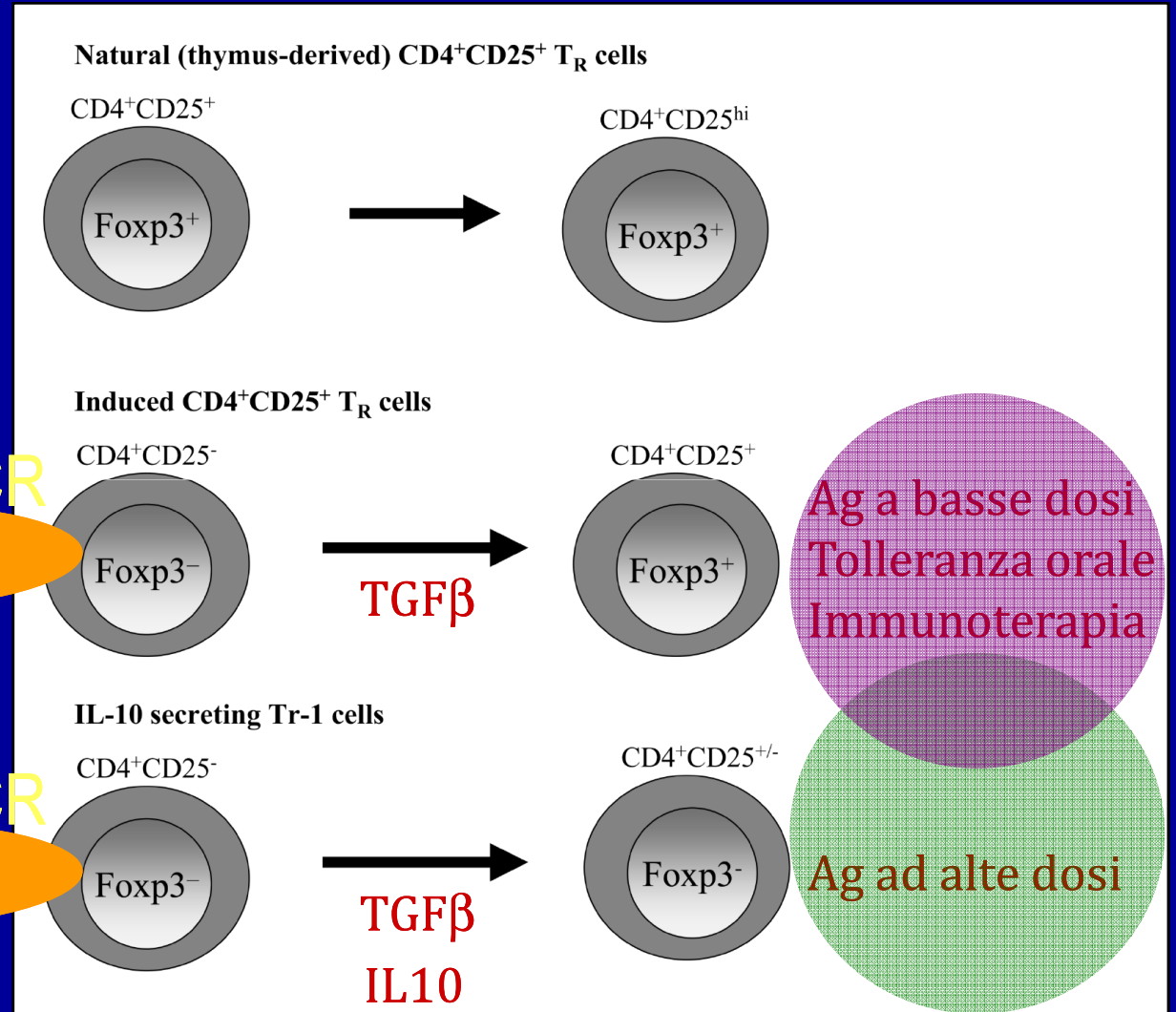
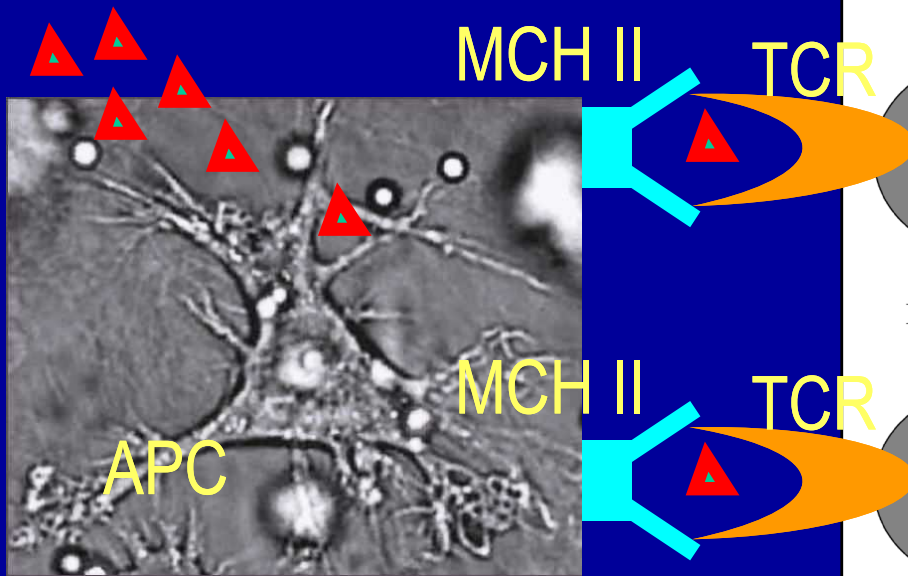
Oral tolerance: is it all retinoic acid?

Acido Retinoico (RA) Cofattore nell'induzione di Foxp3



(modificata)

T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract



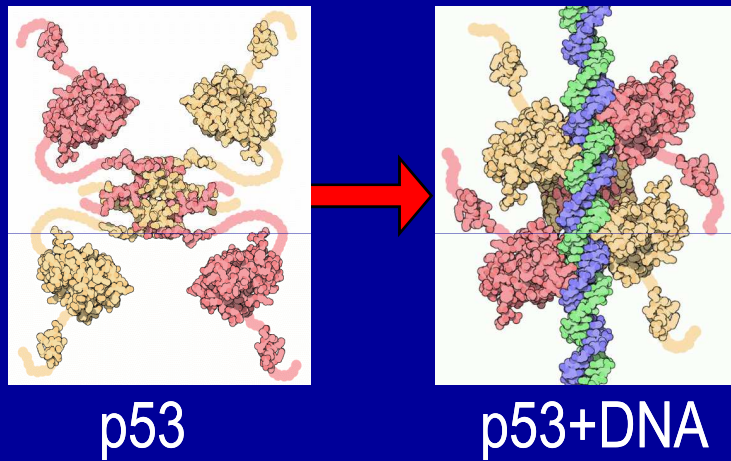
DC immature
(Tolerogenic subset)

Pandiyan et al. *Nat Immunol* 2007;8:1353

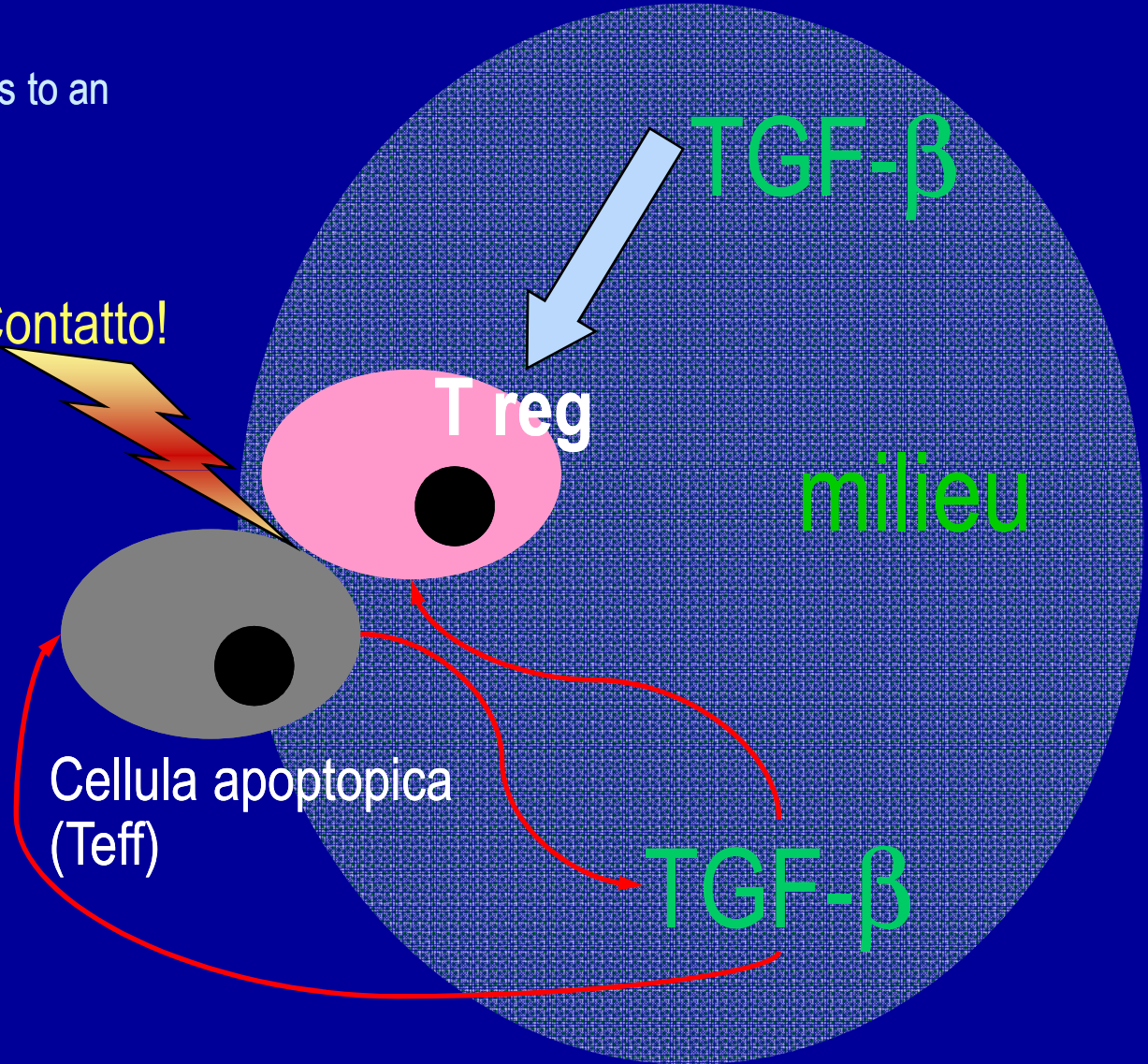
CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation mediated apoptosis of effector CD4+ T cells

Chen et al. *Immunity* 2001; 14:715

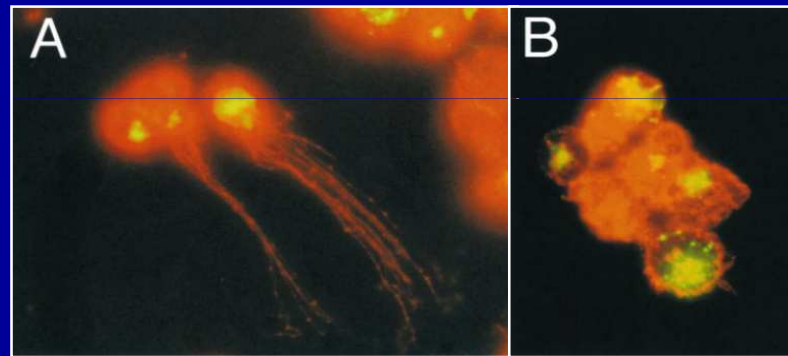
TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu.



Contatto!



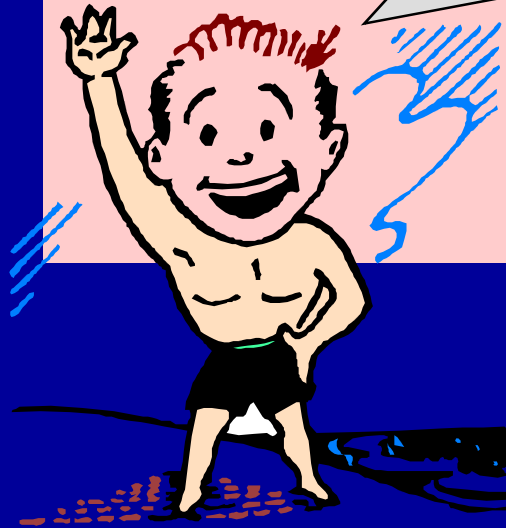
Anche RESPIRARE è un
atto immunologico ...

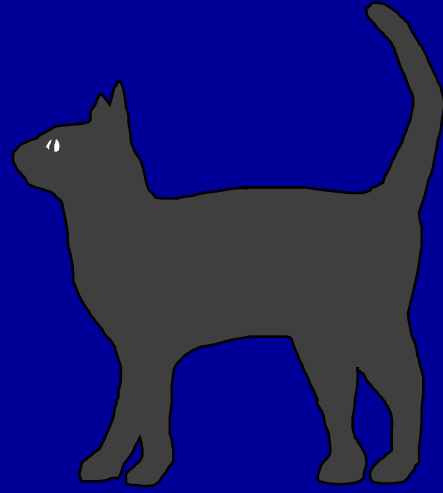


Non abbiamo ancora risposto
alla domanda fondamentale.

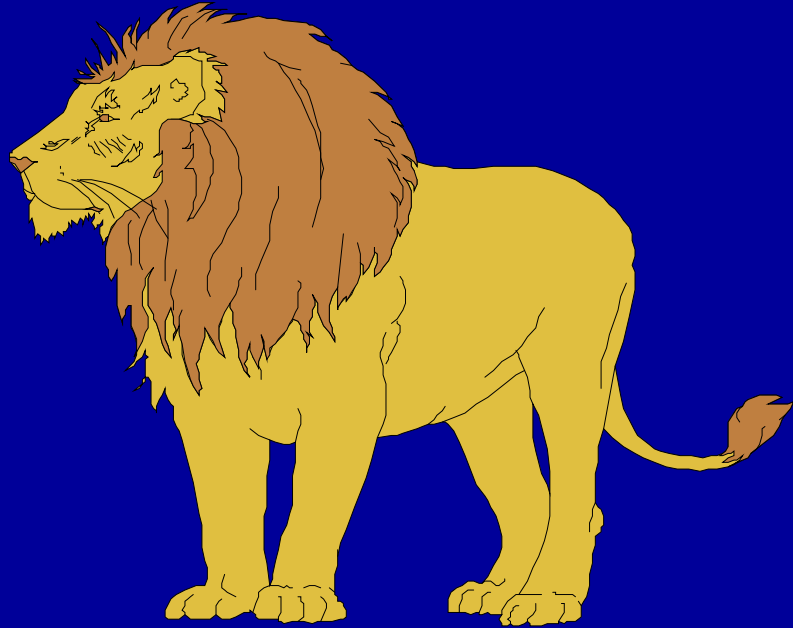
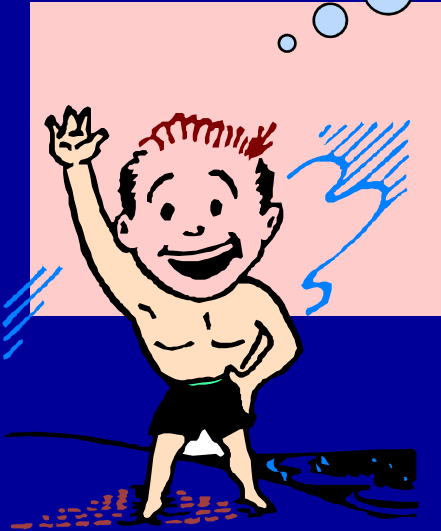
Come fanno le DCs a scegliere?
Perché e cosa scelgono?

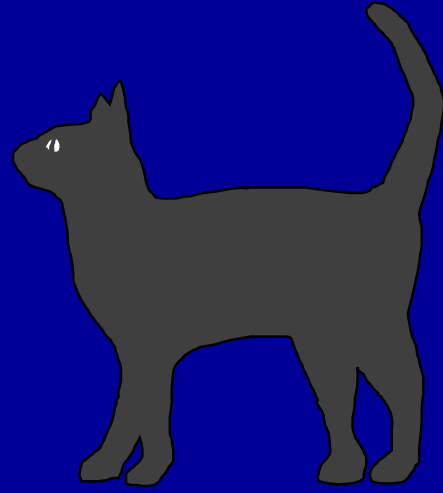
Quale strategia evolutiva
è stata selezionata?





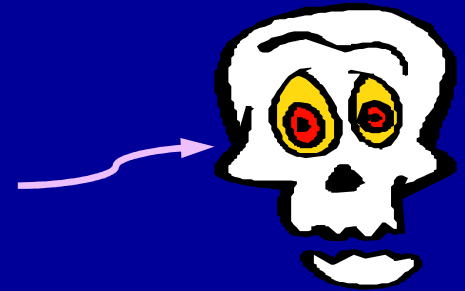
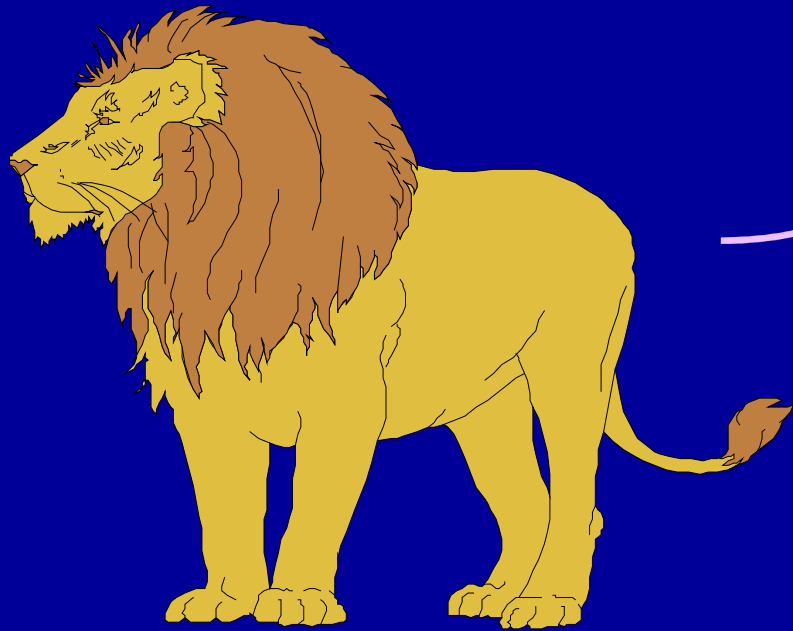
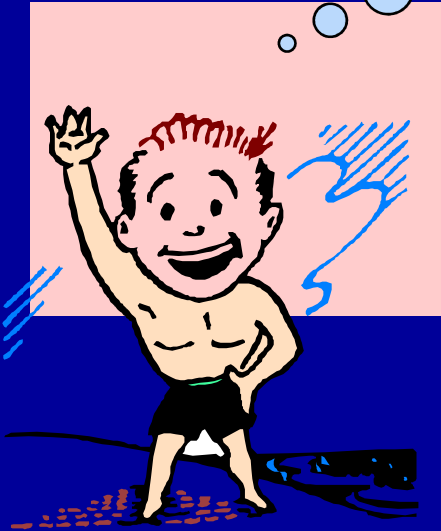
Io vado
incontro a
tutti

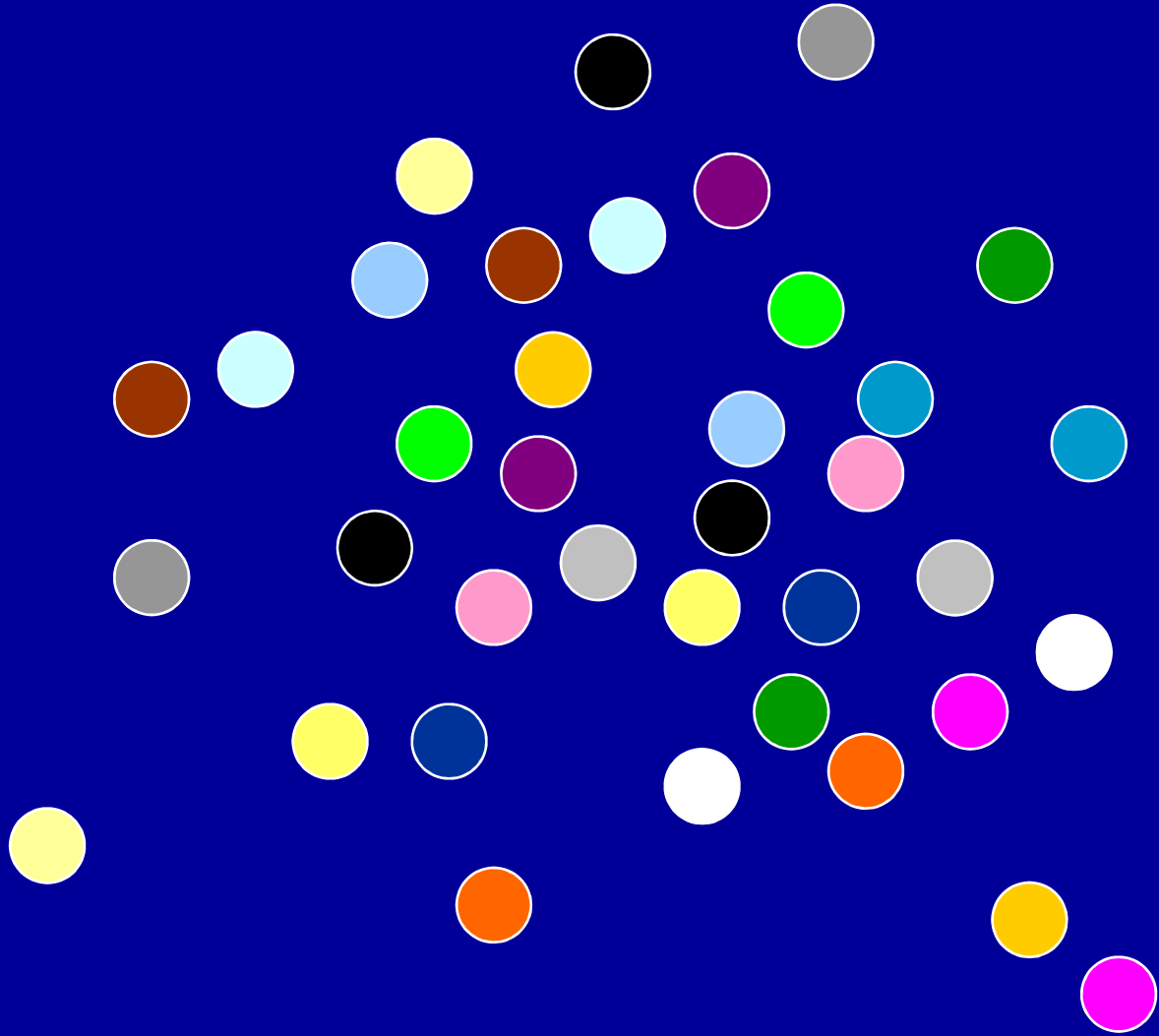
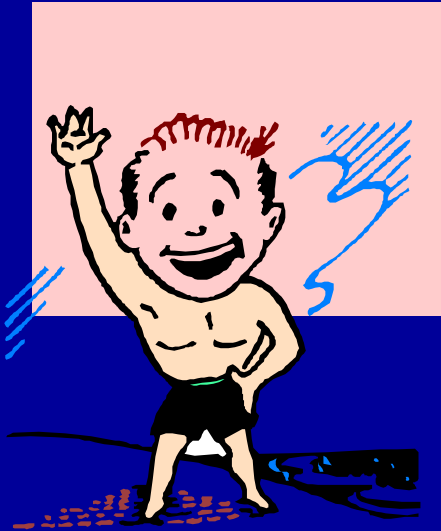


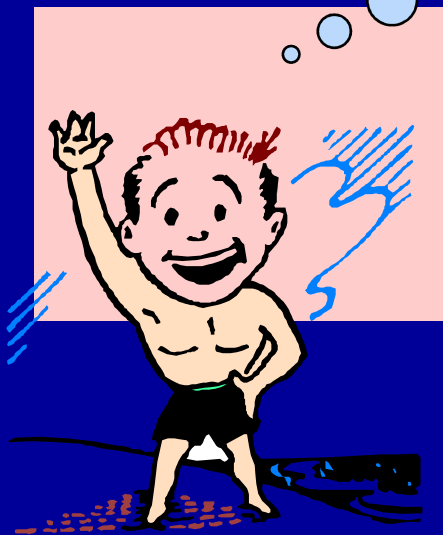


Ok!

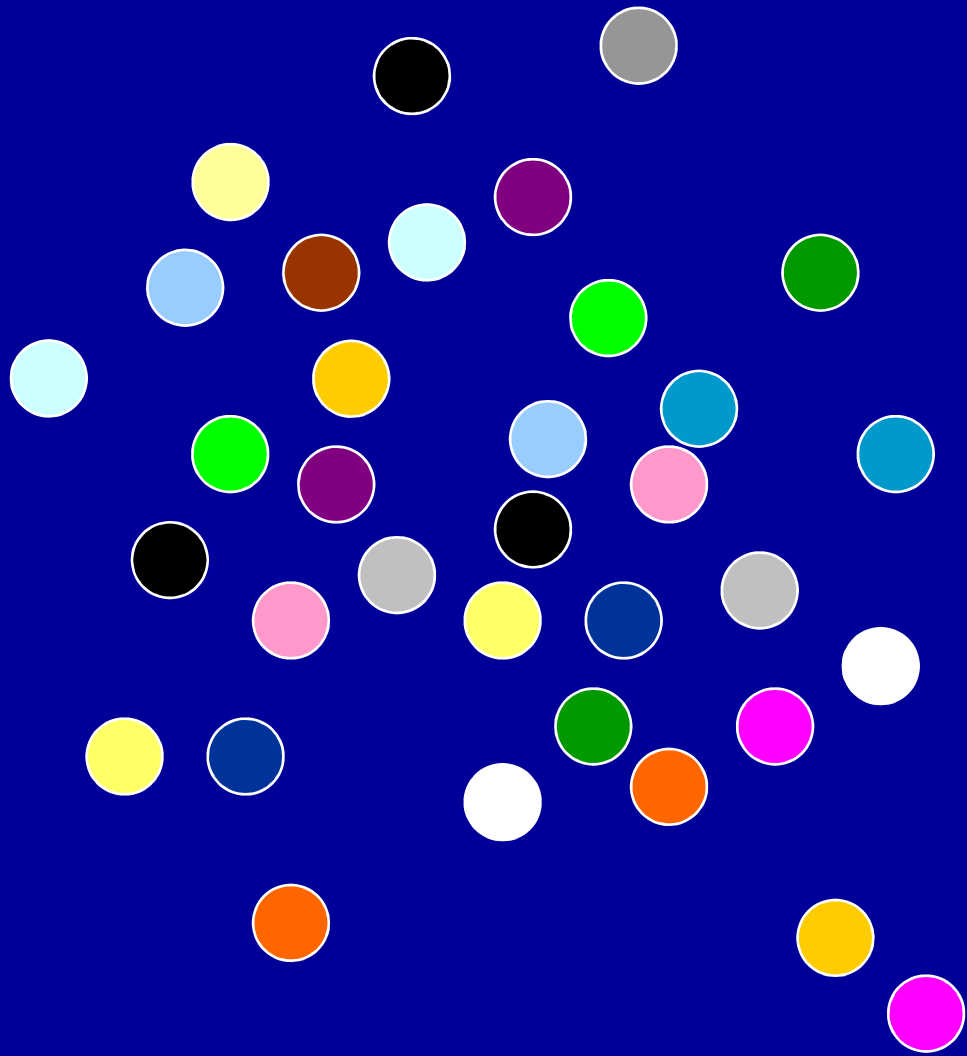
Io vado incontro a tutti

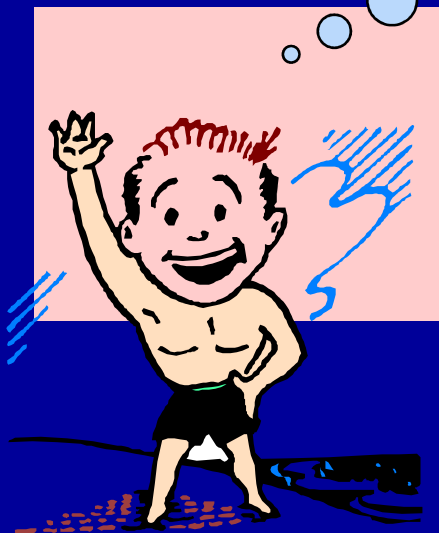






Sono
indifferente
a tutto

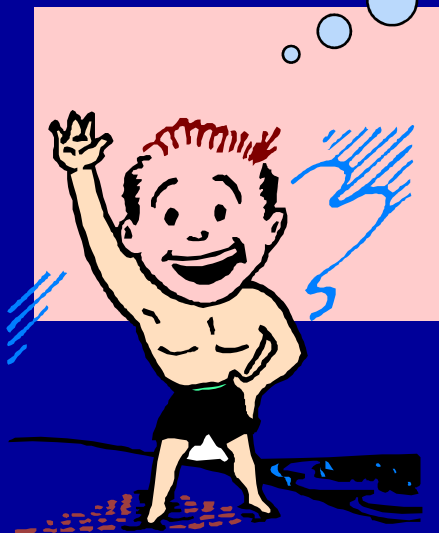




Sono
indifferente
a tutto

Cibi

Ok!
Digestione



Sono
indifferente
a tutto

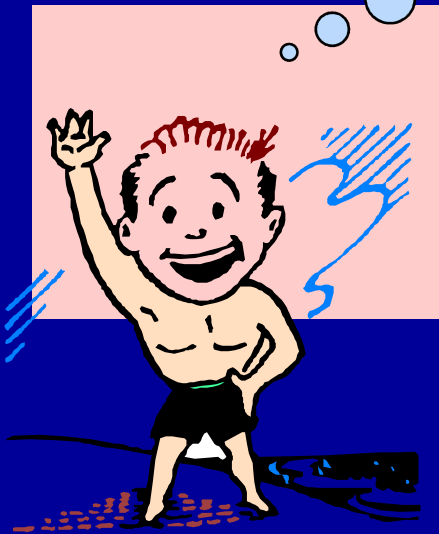
Cibi

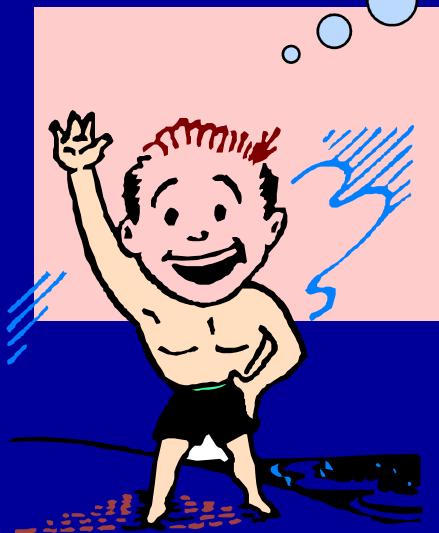
Ok!
Digestione

Patogeni

Estinzione

Mi difendo
attivamente
da tutto



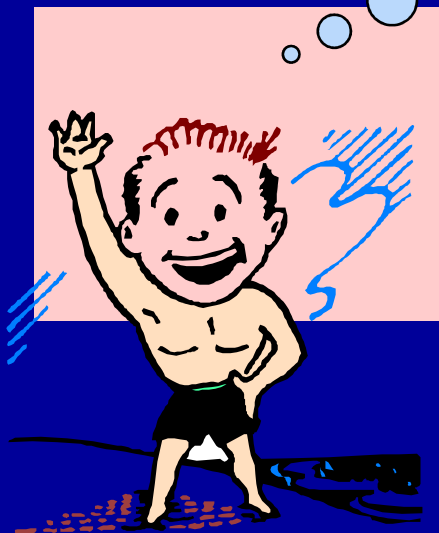


Mi difendo
attivamente
da tutto

Patogeni

Ok!

Risposta innata e adattiva
Infiammazione immunologica



Mi difendo
attivamente
da tutto

Cibi

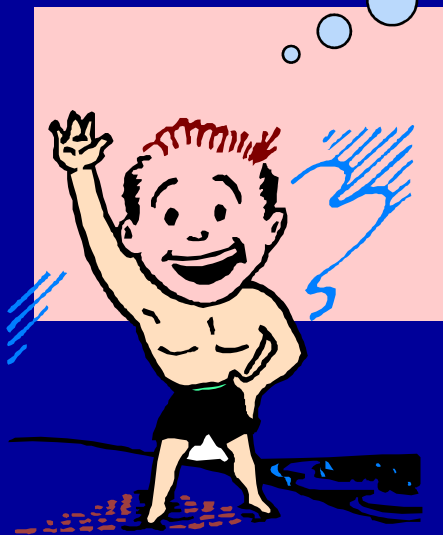


Estinzione

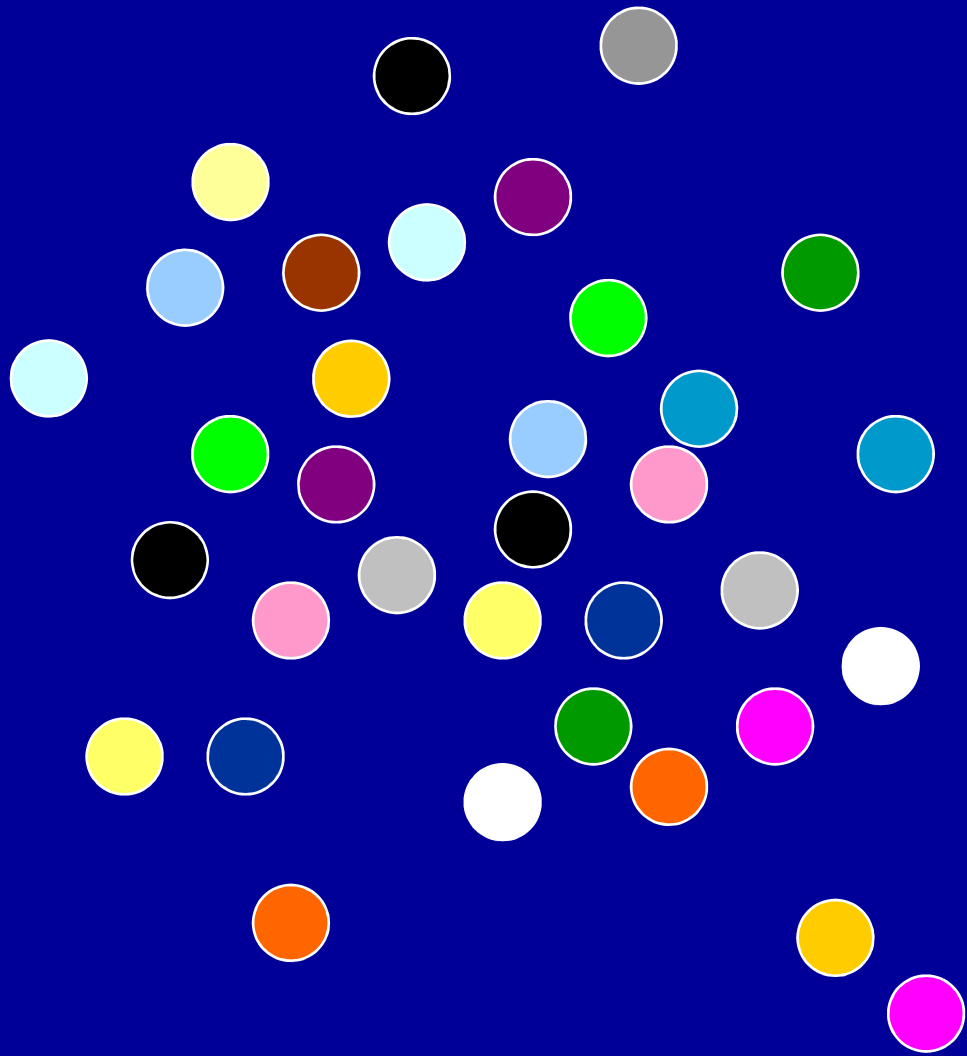
Patogeni

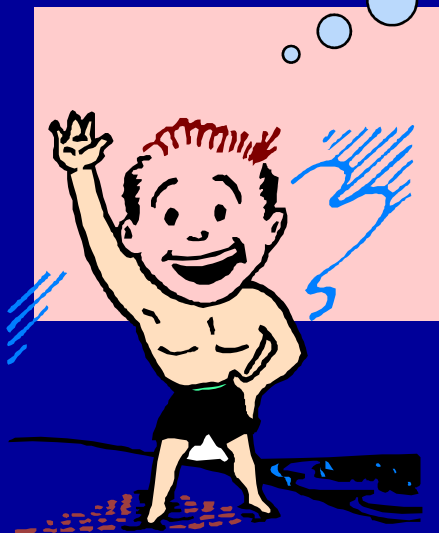


Risposta innata e adattiva
Infiammazione immunologica



Imparo tutto!





Imparo tutto!

Cibi

Ok!
Digestione
Tolleranza immunologica

Patogeni

Ok!
Risposta innata e adattiva
Infiammazione immunologica

Cibo nuovo?

Intolleranza
Infiammazione immunologica

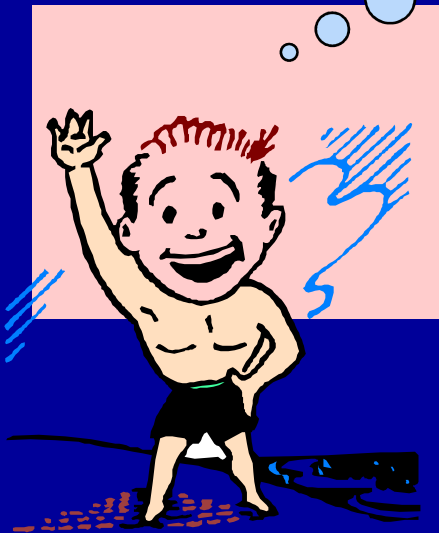
Imparo tutto!

Cibi

Ok!
Digestione
Tolleranza immunologica

Patogeni

Ok!
Risposta innata e adattiva
Infiammazione immunologica



Husby et al. *J Immunol* 1994; 152: 4663

Oral tolerance in humans.

T cell but not B cell tolerance after antigen feeding

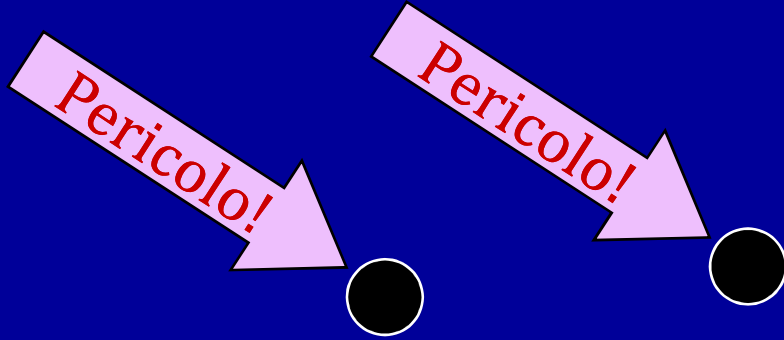
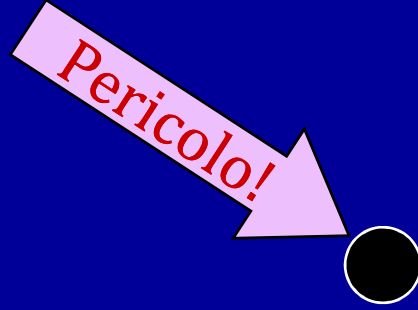
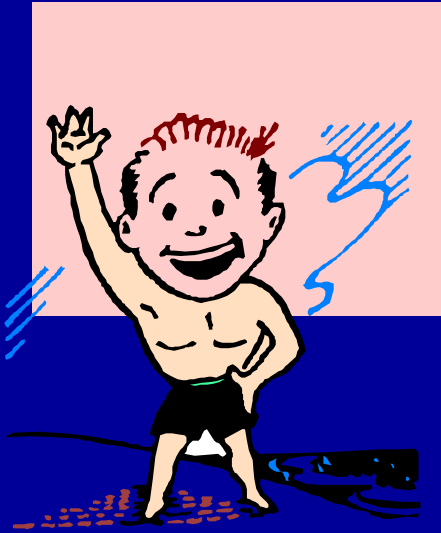
NEO-Antigene

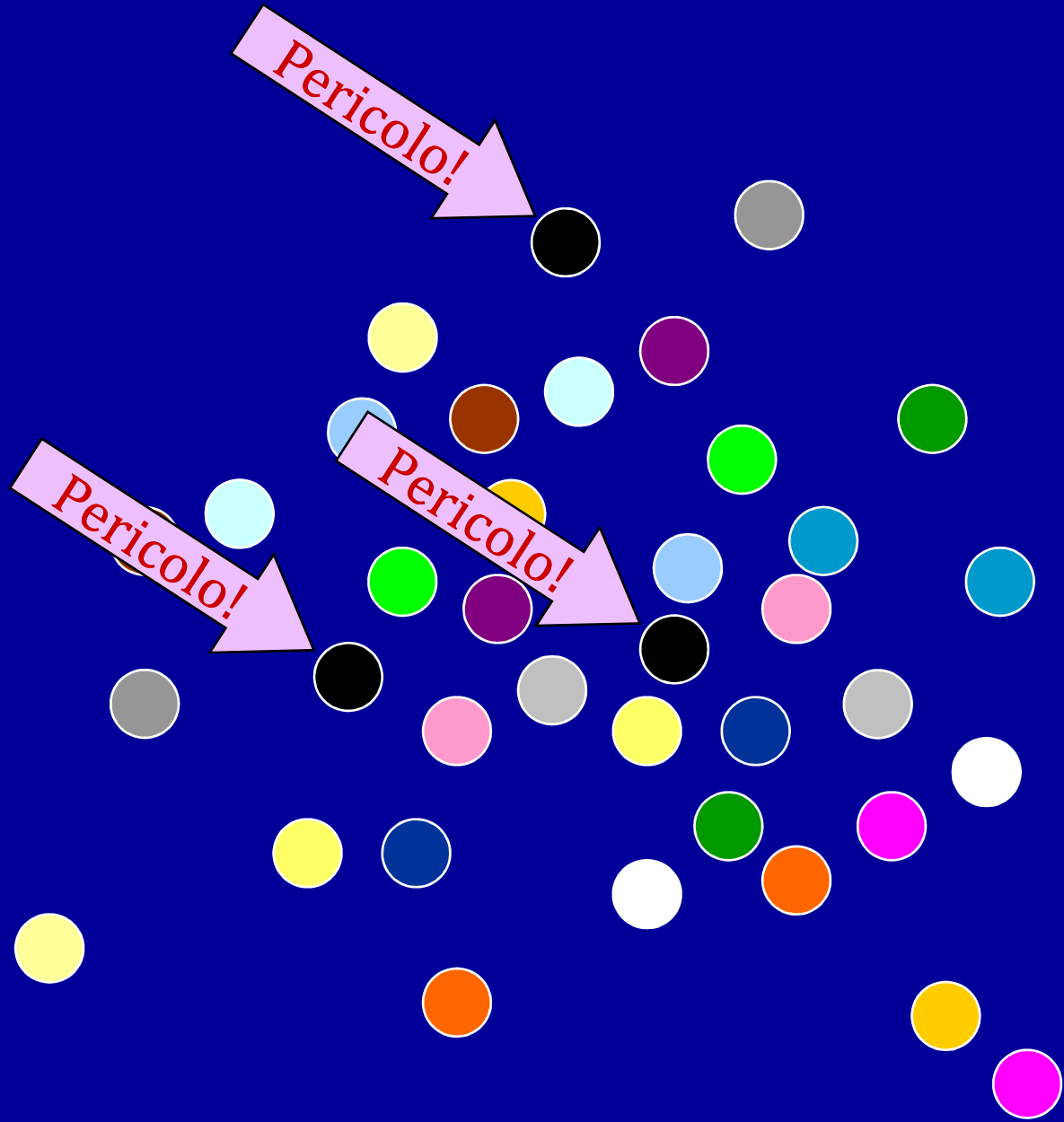
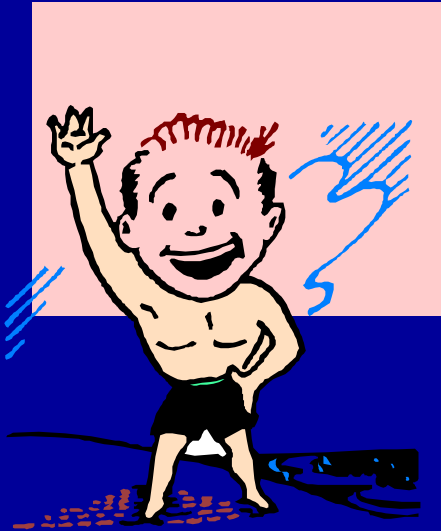
Keyhole limpet hemocyanin

- ✓ Scopo: indurre tolleranza orale nell'UOMO con ingestione prolungata dell'antigene
- ✓ 8 adulti: dose ORALE di 0.5 g di emocianina (KLH) seguita da immunizzazione s.c. con KLH
- ✓ 8 controlli: solo immunizzazione s.c. con KLH
- ✓ FED KLH: riduzione della proliferazione T-cell KLH-specifica ($p = 0.04$) e della risposta cutanea ritardata ($p = 0.07$) a KLH.



L'EMOCIANINA induce una risposta sistemica tollerogena mediata dalle T-cell e non induce una risposta anticorpale (immunogena) di tipo B-cell, sia a livello sistemico che mucosale.



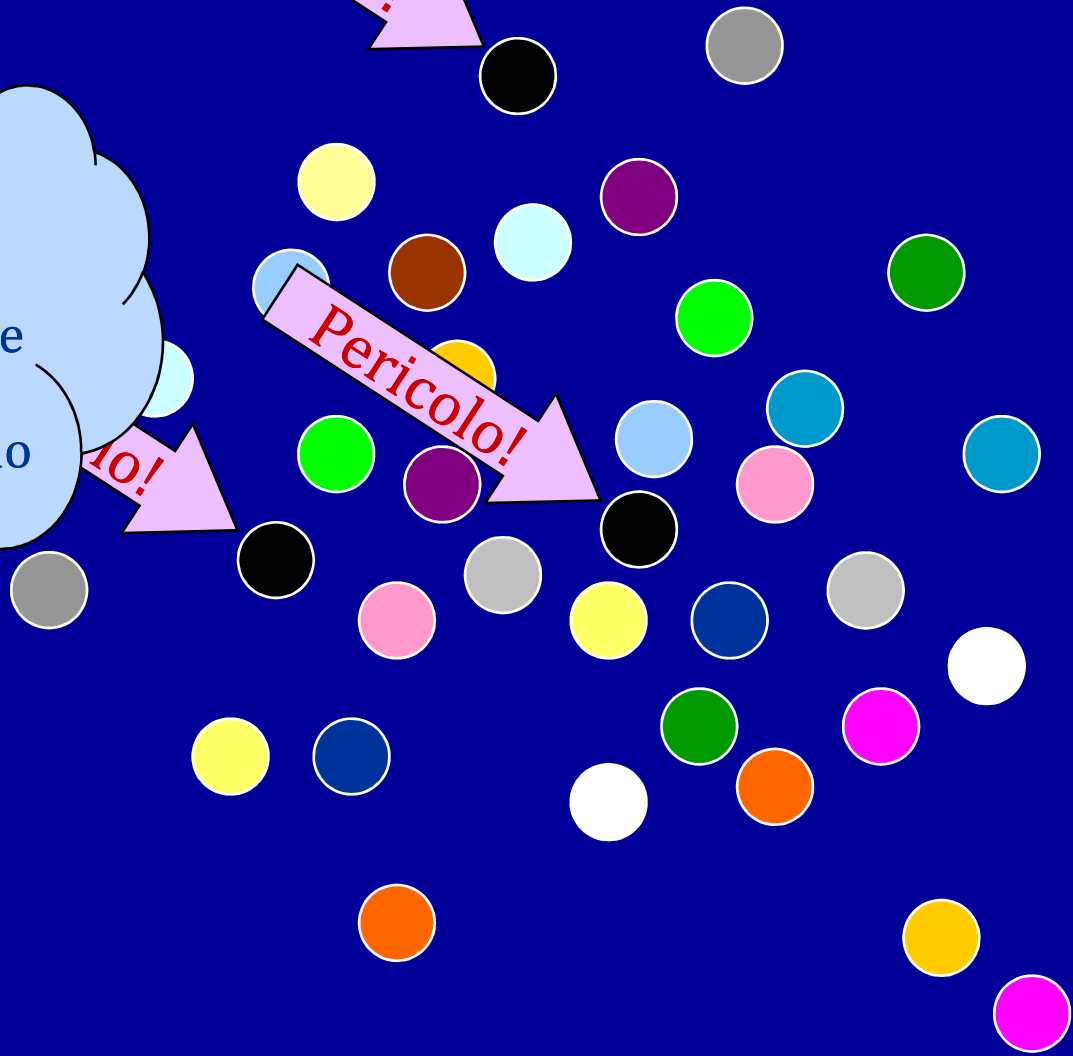
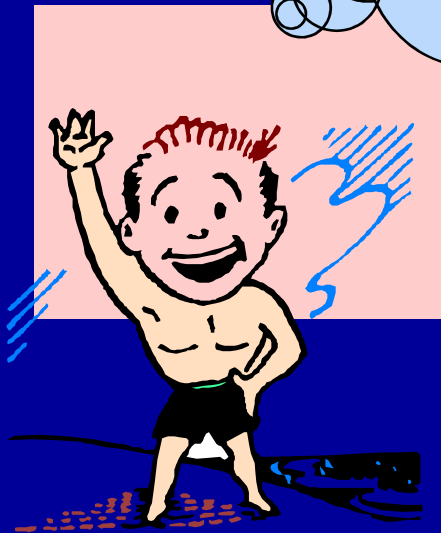


Tollero tutto
attivamente e
senza conoscere
A MENO CHE
non sia patogeno

Pericolo!

Pericolo!

Pericolo!



Cibo nuovo

Tolleranza ATTIVA

Tollero tutto
attivamente e
senza conoscere
A MENO CHE
non sia patogeno

Cibi

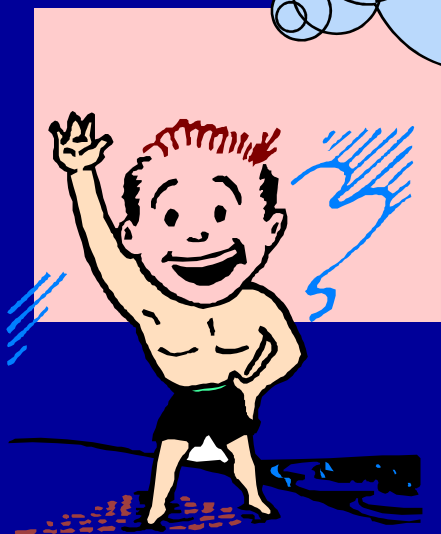
Ok!

Digestione
Tolleranza attiva

Patogeni

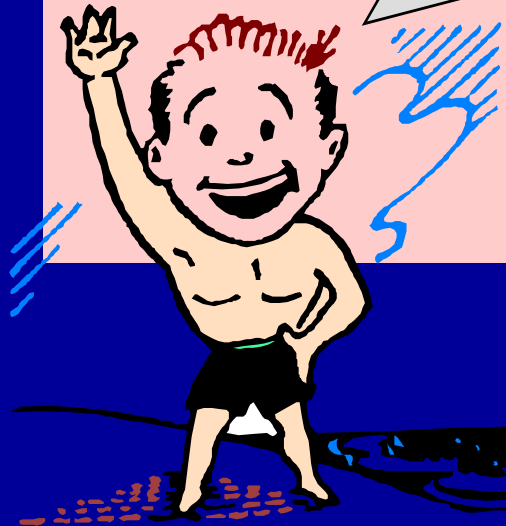
Ok!

Risposta innata e
adattiva



Come faccio a riconoscere
ciò che è patogeno?

L'immunità innata e i TLRs ...

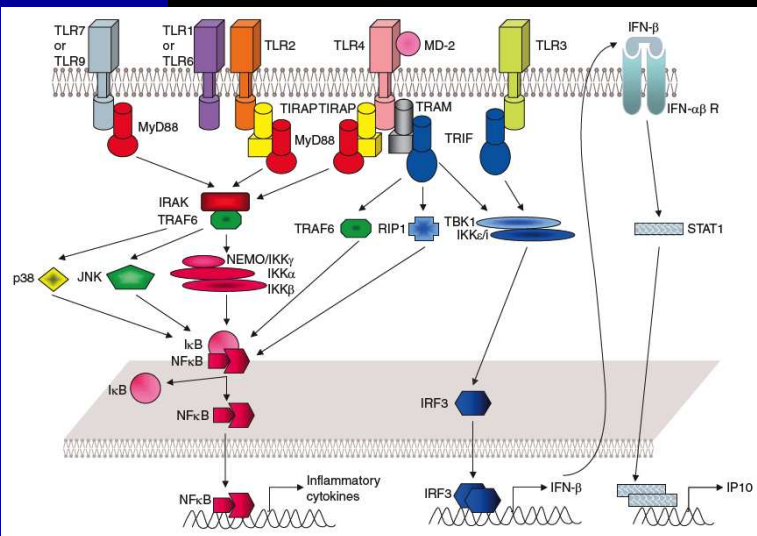
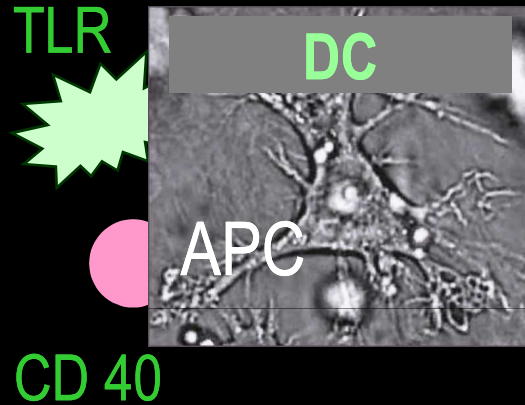


Homer. *JACI* 2006; 117:1133

Toll-like receptor ligands and atopy - A coin with at least two sides

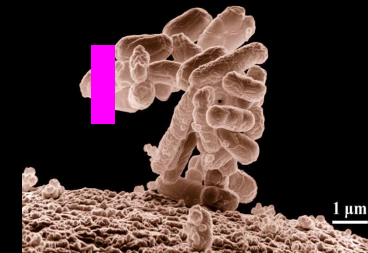
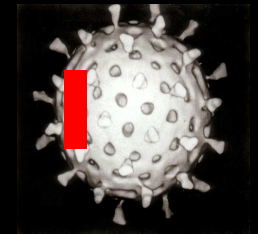
Pathogen-associated molecular patterns

TLRs



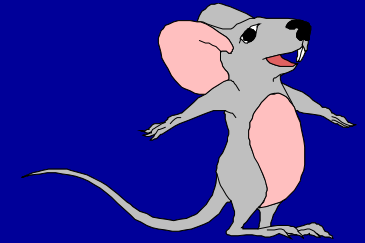
TLR1	↔	
TLR2	↔	Peptidoglicani (PNG)
TLR3	↔	DS-RNA
TLR4	↔	LPS
TLR5	↔	Flagellina
TLR6	↔	
TLR7	↔	Virus SS-RNA
TLR8	↔	Virus SS-RNA
TLR9	↔	Sequenze DNA
TLR10	↔	
TLR11	↔	Uropathogenic b.
TLRn	↔	

PAMPs

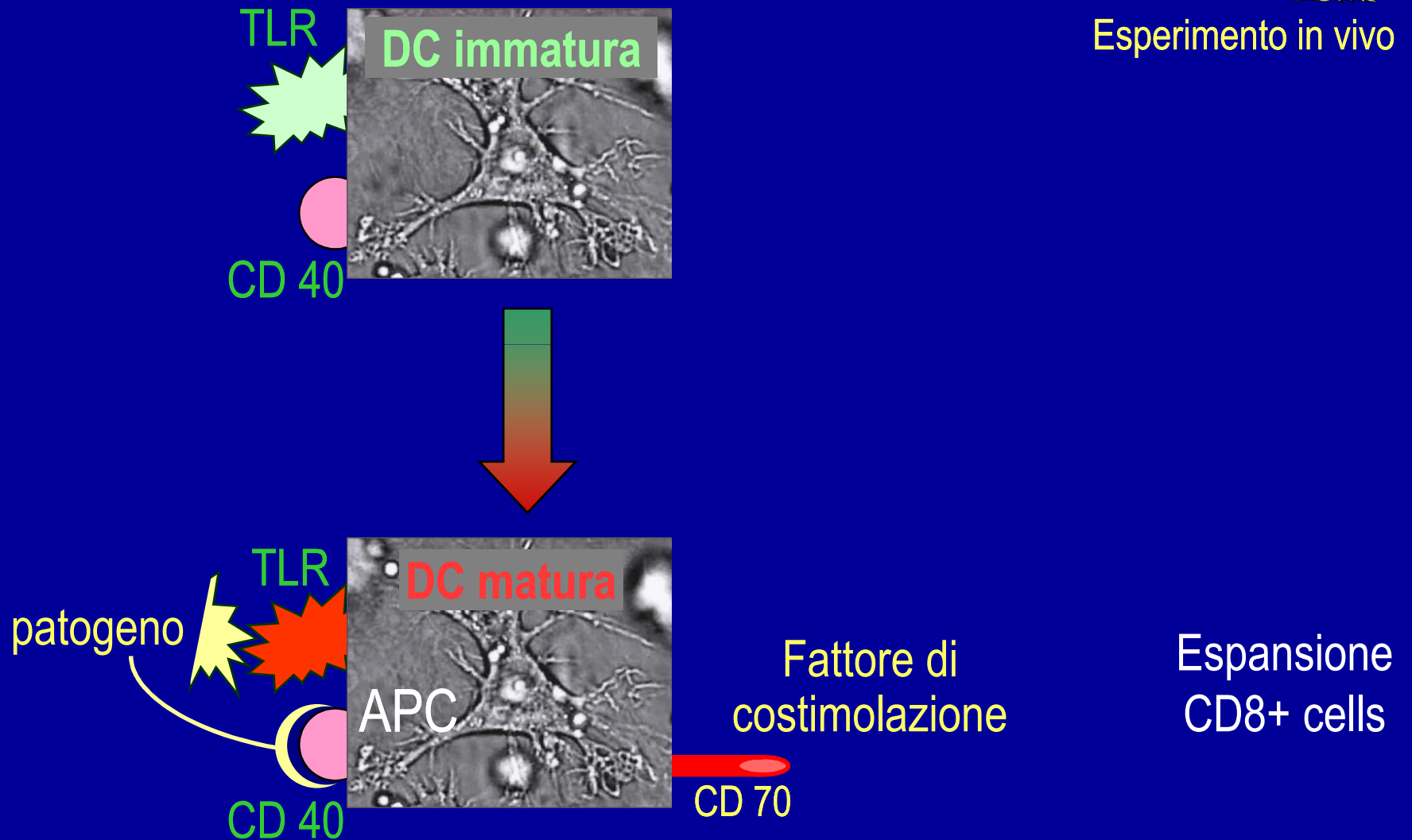


Sanchez et al. *J Immunol* 2007; 178:1564

Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity
by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo



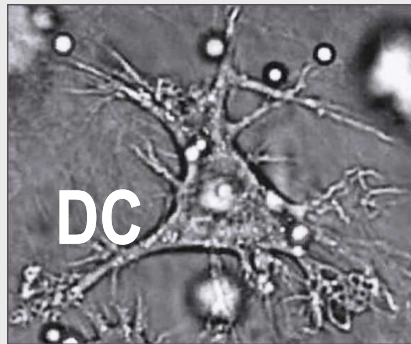
Esperimento in vivo



Keller et al. *Immunity* 2008; 29:934

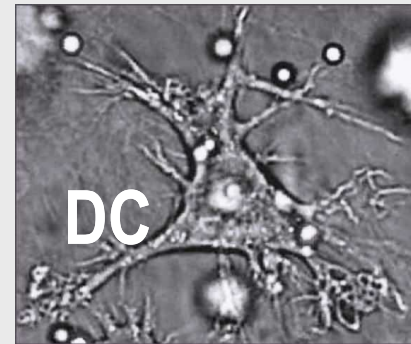
Expression of costimulatory ligand CD70 on steady-state dendritic cells breaks CD8+ T cell tolerance and permits effective immunity

Topo CD27-KO

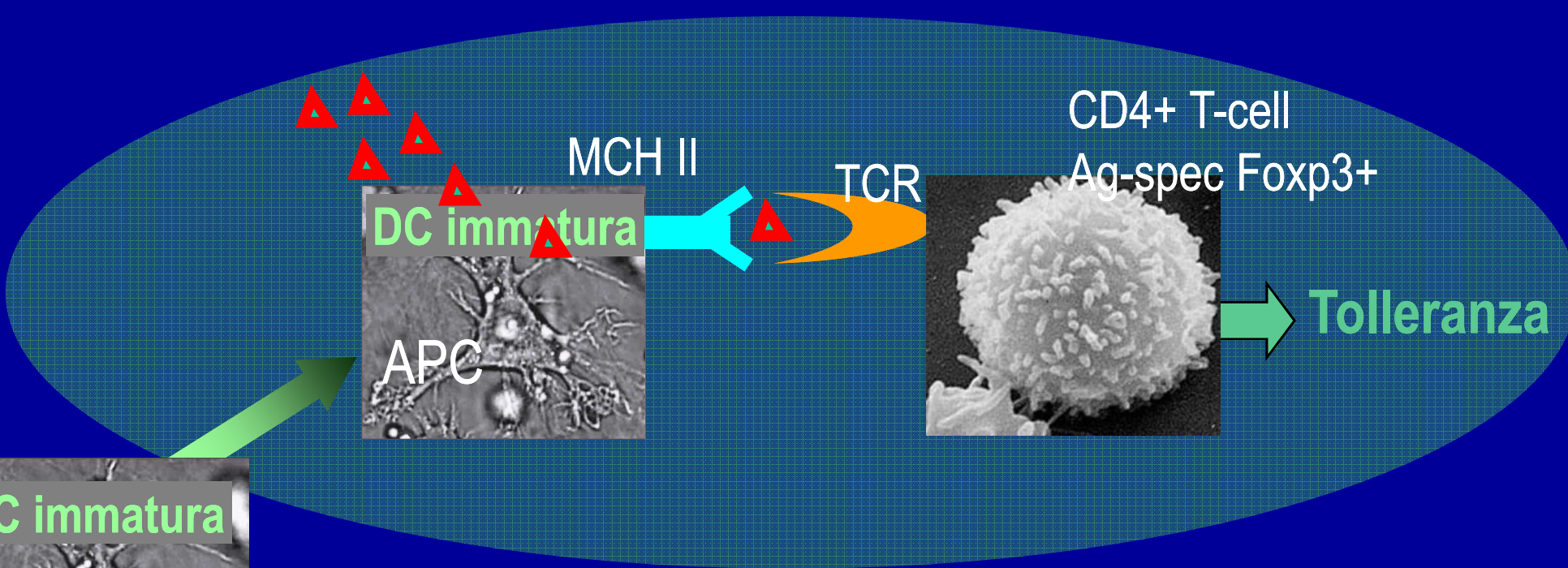


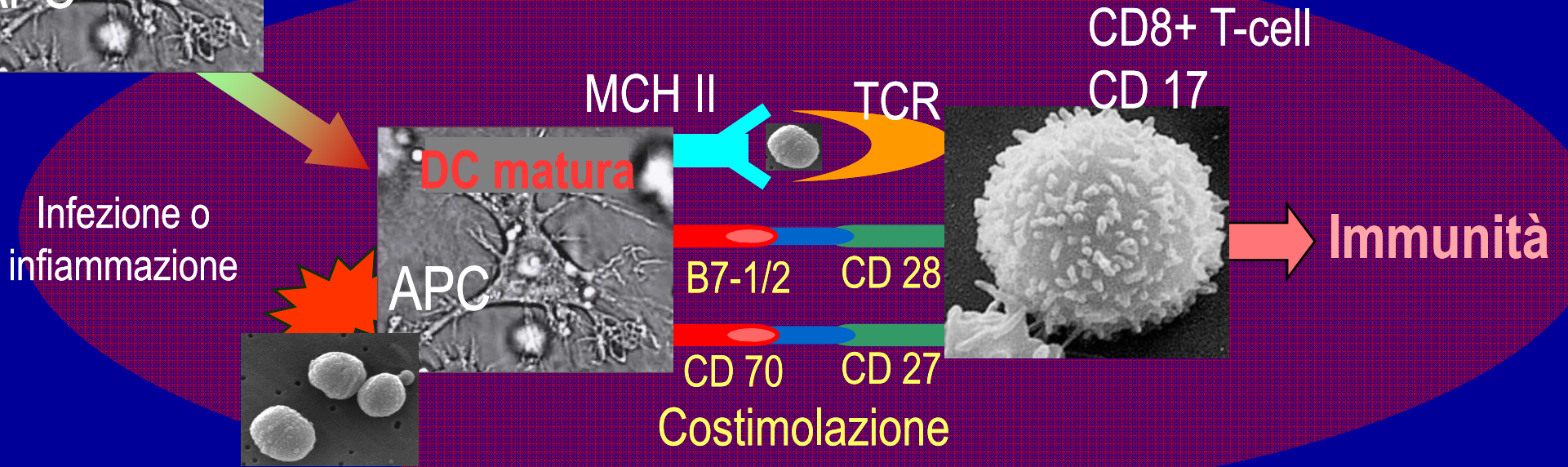
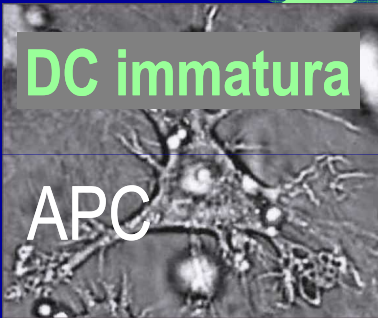
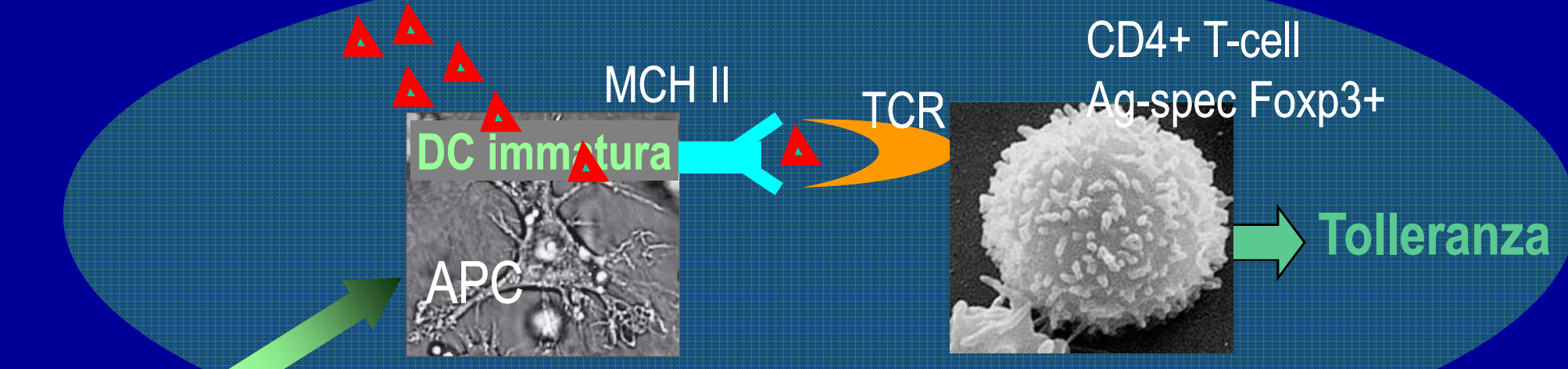
Tolleranza

Topo CD27-KO
& CD 70 indotto

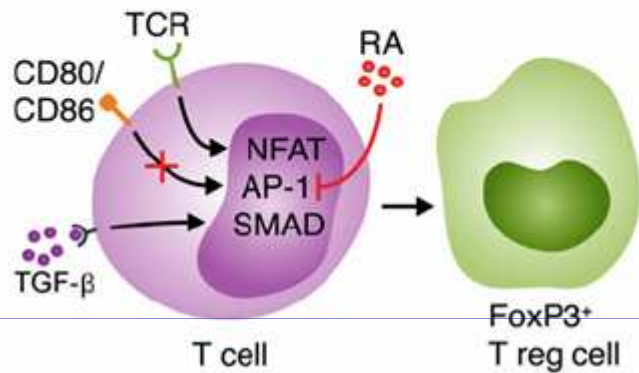


Immunità

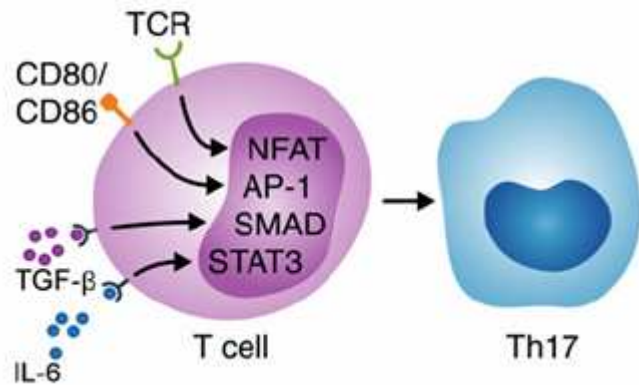




Tollero tutto ...



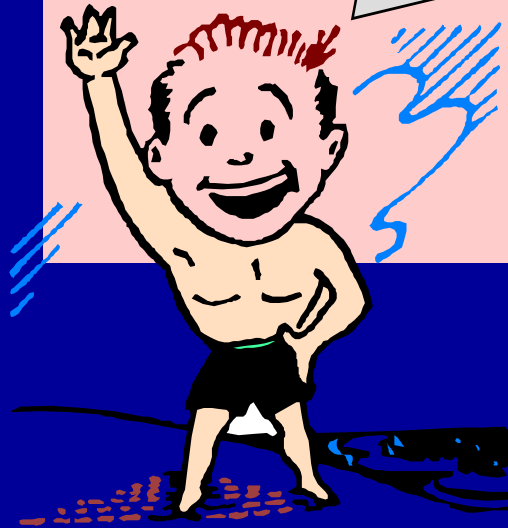
a meno che ...



La mancanza di
CO-STIMOLAZIONE
(CD80/86) e di IL6 evita la
formazione dei fattori di
trascrizione AP-1 e STAT3.

Il risultato è la formazione di
Treg Foxp3⁺ anziché Th17

Il polimorfismo o il mal funzionamento dei TLRs possono spiegare sia le malattie allergiche, i problemi alimentari non IgE-medaiti, le malattie infiammatorie intestinali e anche alcune patologie tumorali ...

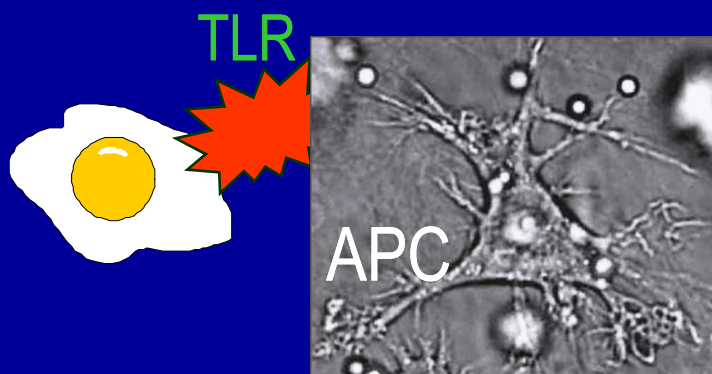


Mal funzionamento del TLR (Patologia da TLR?)

Modulazione

- via fumo materno (Noakes, 2006)
- via latte materno (PUFA) (Weatherill, 2005, Le Bouder 2006)

Mutazione e Stimolazione diretta (?)



Thomas, *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 175:5724

Polimorfismo TLR4

- (Virus, batteri, miceti)
- Malaria grave (Mockenhaupt, 2010)
- Neurocisticercosi (Tenia s.) (Verma, 2010)
- Candidosi sistemica (Van der Graaf, 2006)
- Filariasi (TLR2) (Junpee, 2010)

- Cancro endometrio (Ashton, 2010)
- Cancro prostata (Vidan, 2010)
- Gastrite atrofica, H.Pylory (Hishida, 2009)

- Malattia di Crohn (con NOD2) (Brand, 2005)

Polimorfismo TLR2 & 4

- Asma da inquinanti (Kerhof, 2010)

Polimorfismo TLR10

- Asma (Lazarus, 2004; Eder, 2004; Smit 2007)



Infanzia

Maturità



Infanzia

Maturità

Carenza fattori protettivi
(muco, acidità, sali biliari)

Immaturità IgAs,
bassa attività enzimatica

Immaturità SI innato e
adattivo



Germ free

Infanzia

Maturità

Carenza fattori protettivi
(muco, acidità, sali biliari)

Immaturità IgAs,
bassa attività enzimatica

Immaturità SI innato e
adattivo

Eccesso di molecole
intere



Infanzia

Maturità

Carenza fattori protettivi
(muco, acidità, sali biliari)

Immaturità IgAs,
bassa attività enzimatica

Immaturità SI innato e
adattivo

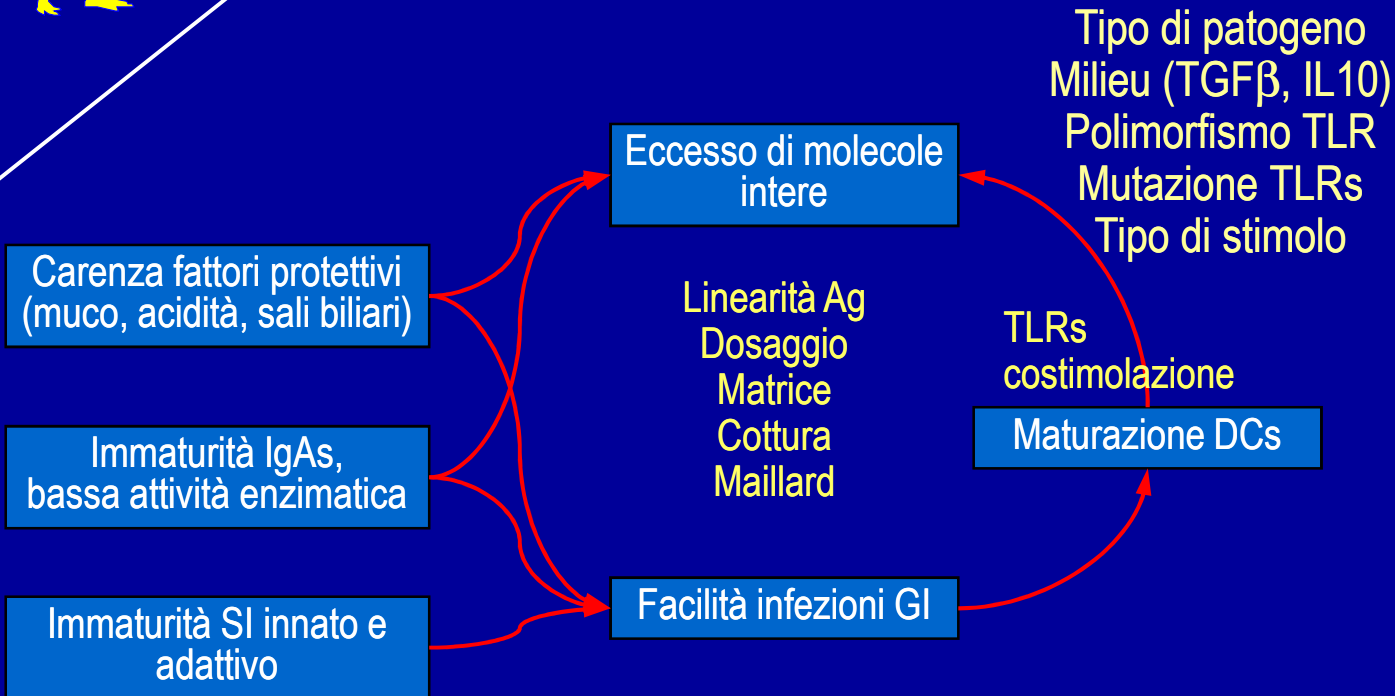
Eccesso di molecole
intere

Facilità infezioni GI



Infanzia

Maturità





Infanzia

Maturità

- Nessuna manifestazione
- Andamento capriccioso
- Orticarie fugaci
- Elevazione transitoria delle IgE
- (Malattia IgE lieve)
- Malattia NON-IgE

Tipo di patogeno
Milieu (TGF β , IL10)
Polimorfismo TLR
Mutazione TLRs
Tipo di stimolo

Eccesso di molecole
intere

Carenza fattori protettivi
(muco, acidità, sali biliari)

Immaturità IgAs,
bassa attività enzimatica

Immaturità SI innato e
adattivo

Linearità Ag
Dosaggio
Matrice
Cottura
Maillard

TLRs
costimolazione

Maturazione DCs

Facilità infezioni GI



Infanzia

Maturità

- Nessuna manifestazione
- Andamento capriccioso
- Orticarie fugaci
- Elevazione transitoria delle IgE
- (Malattia IgE lieve)
- Malattia NON-IgE

Tipo di patogeno
Milieu (TGF β , IL10)
Polimorfismo TLR
Mutazione TLRs
Tipo di stimolo

Eccesso di molecole
intere

Carenza fattori protettivi
(muco, acidità, sali biliari)

Immaturità IgAs,
bassa attività enzimatica

Immaturità SI innato e
adattivo

Linearità Ag
Dosaggio
Matrice
Cottura
Maillard

TLRs
costimolazione

Maturazione DCs

Facilità infezioni GI

- Probabile risoluzione
del quadro (da piccolo ...)



Germ free

Infanzia

Maturità

- Nessuna manifestazione
- Andamento capriccioso
- Orticarie fugaci
- Elevazione transitoria delle IgE
- (Malattia IgE lieve)
- Malattia NON-IgE

Tipo di patogeno
Milieu (TGF β , IL10)
Polimorfismo TLR
Mutazione TLRs
Tipo di stimolo

Eccesso di molecole
intere

Carenza fattori protettivi
(muco, acidità, sali biliari)

Immaturità IgAs,
bassa attività enzimatica

Immaturità SI innato e
adattivo

Linearità Ag
Dosaggio
Matrice
Cottura
Maillard

TLRs
costimolazione

Maturazione DCs

Facilità infezioni GI

Background
atopico

- (Nessuna manifestazione)
- Andamento più deciso
- Elevazione persistente delle IgE
- Malattia importante (IgE mediata)

- Probabile risoluzione
del quadro (da piccolo ...)



Germ free

Infanzia

Maturità

- Nessuna manifestazione
- Andamento capriccioso
- Orticarie fugaci
- Elevazione transitoria delle IgE
- (Malattia IgE lieve)
- Malattia NON-IgE

- Probabile risoluzione del quadro (da piccolo ...)

Tipo di patogeno
Milieu (TGFβ, IL10)
Polimorfismo TLR
Mutazione TLRs
Tipo di stimolo

Eccesso di molecole intere

Carenza fattori protettivi (muco, acidità, sali biliari)

Immaturità IgAs, bassa attività enzimatica

Immaturità SI innato e adattivo

Linearità Ag
Dosaggio
Matrice
Cottura
Maillard

TLRs costimolazione

Maturazione DCs

Facilità infezioni GI

Background atopico

- (Nessuna manifestazione)
- Andamento più deciso
- Elevazione persistente delle IgE
- Malattia importante (IgE mediata)

- Probabile persistenza del quadro
- Probabile insorgenza di altre patologie allergiche (respiratorie)

Kraus et al. *Gastroenterology* 2004; 126:1771

Failure to induce oral tolerance to a soluble protein
in patients with inflammatory bowel disease

NEO-Antigene

Keyhole limpet hemocyanin



Controlli sani

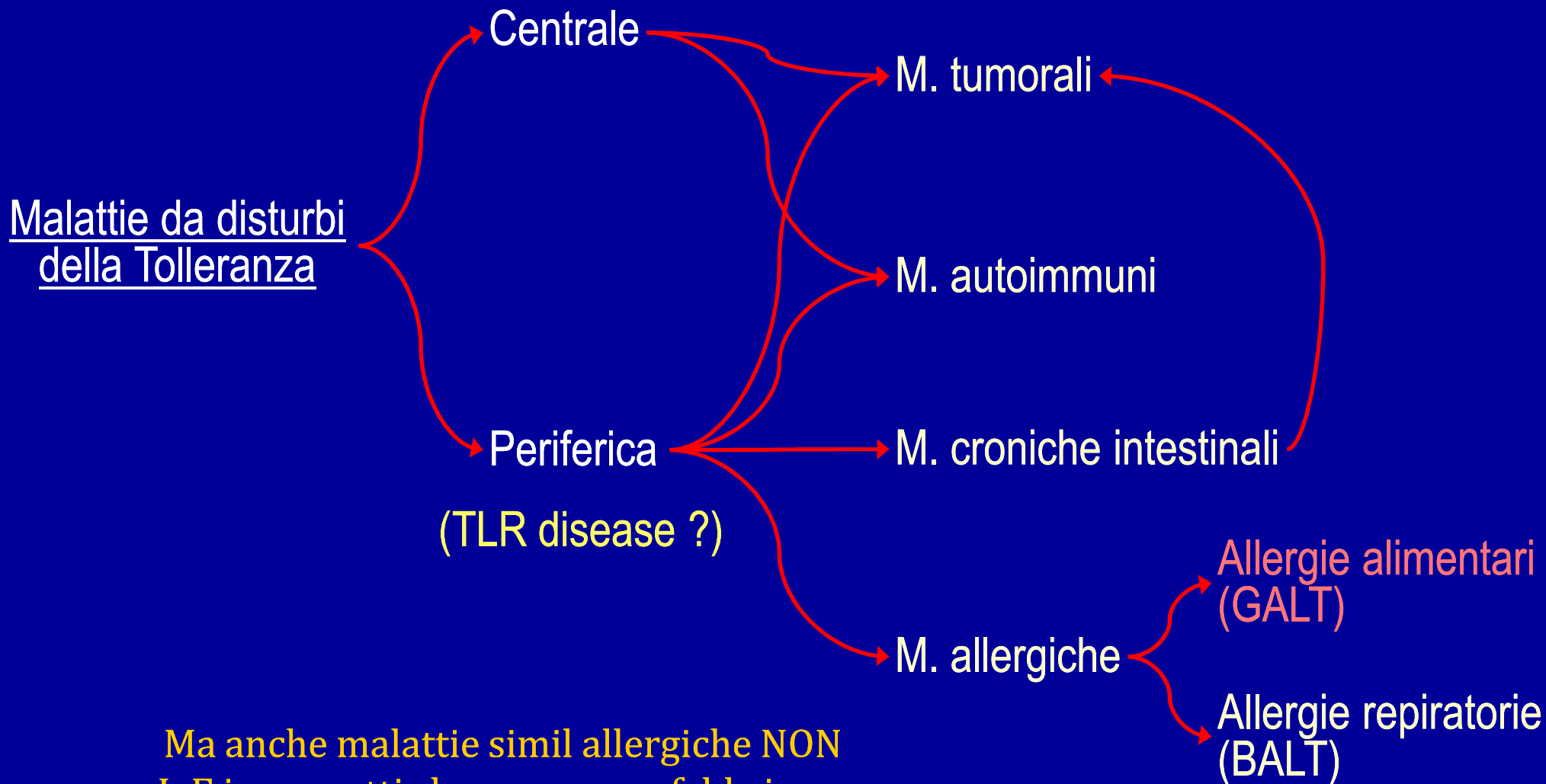
**Risposta
TOLLEROGENICA**

Malattia di Crohn

Rettocolite ulcerosa

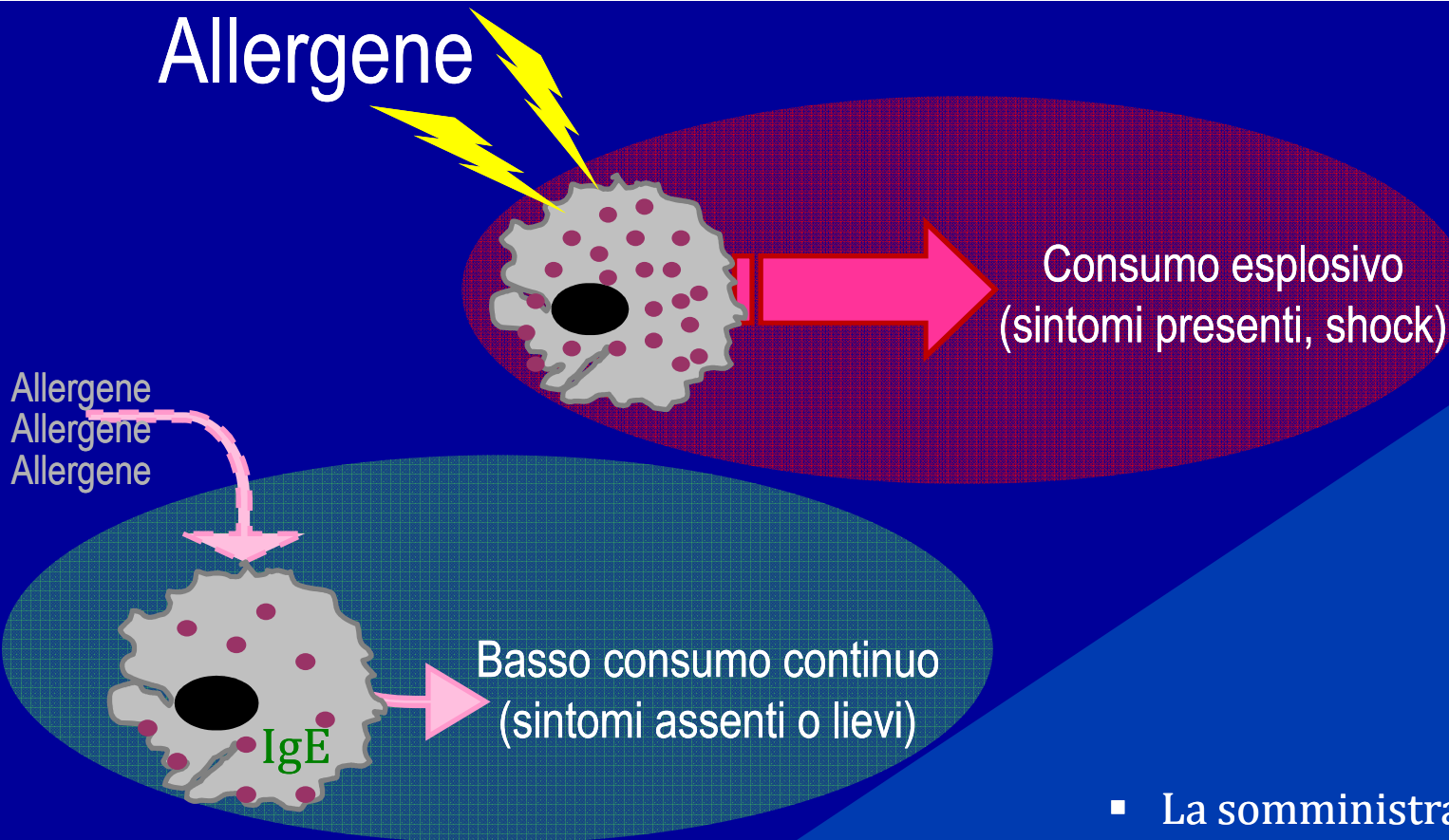
Anomalia genetica
Risposta immune
aberrante vs normale
flora enterica
(TLRs)

**Risposta
IMMUNOGENICA
(NON tolleranza)**

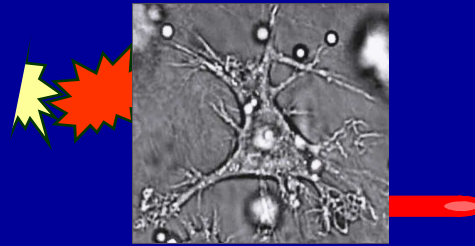
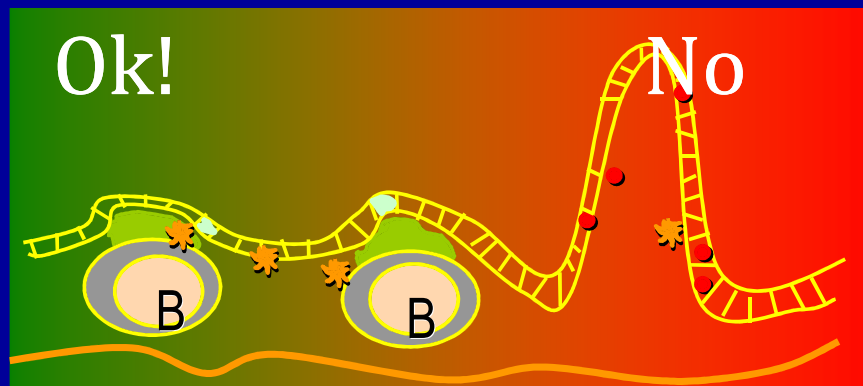


Ma anche malattie simil allergiche NON IgE in soggetti che non sanno fabbricare IgE (aggiungere freccia)

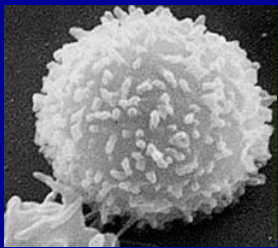
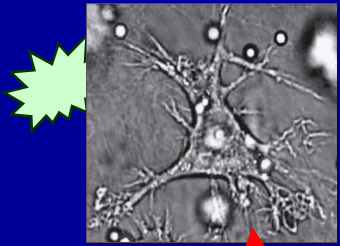
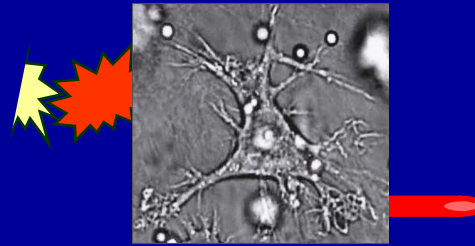
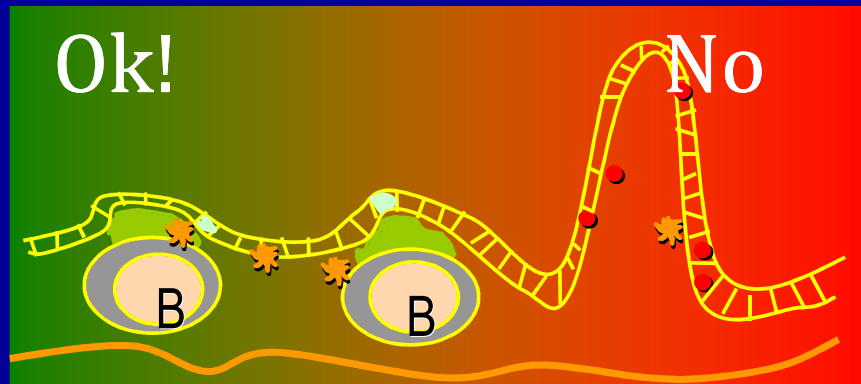
Allergene



- La somministrazione (iniziando delle basse dosi) permette all'organismo di sopportare il cibo senza danno.
Quantità maggiori indurrebbero sintomi e quindi la cessazione del trattamento.
- Un meccanismo di tolleranza immediato, descritto bene nel topo, è la internalizzazione delle IgE per cui si toglie substrato al cibo

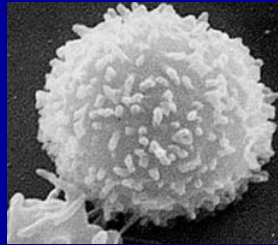


- E' importante, in questa fase, non indurre infiammazione intestinale (basse dosi) né che sia già o ancora presente infezione/infiammazione intestinale (attivazione dei TLRs)



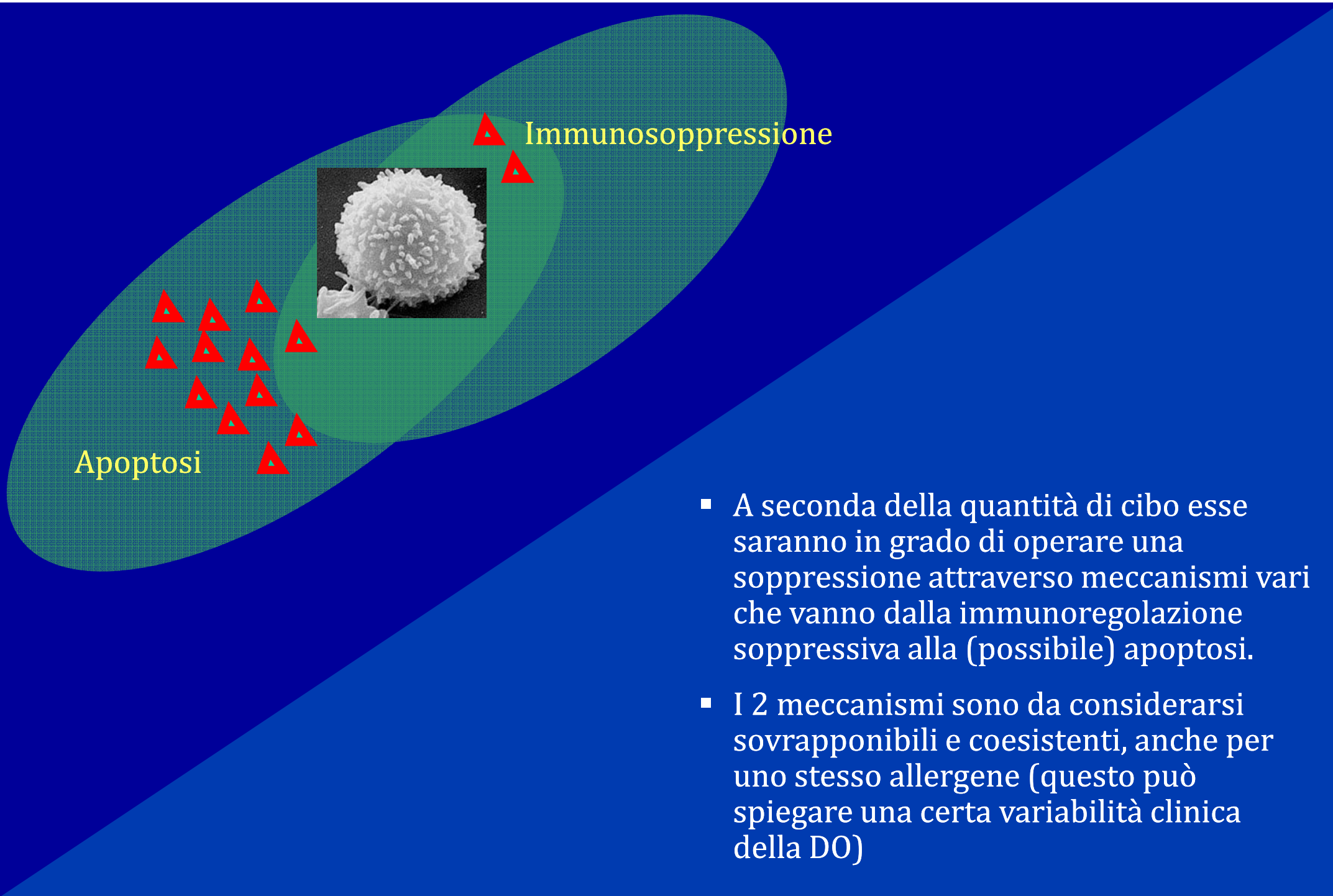
- E' importante, in questa fase, non indurre infiammazione intestinale (basse dosi) né che sia già o ancora presente infezione/infiammazione intestinale (attivazione dei TLRs)
- La presentazione del cibo alle APCs (DCs) in condizioni NON INFIAMMATORIE permette (di nuovo o ex-novo) di (re)innescare il fenomeno attivo della tolleranza (T reg)

Immunosoppressione

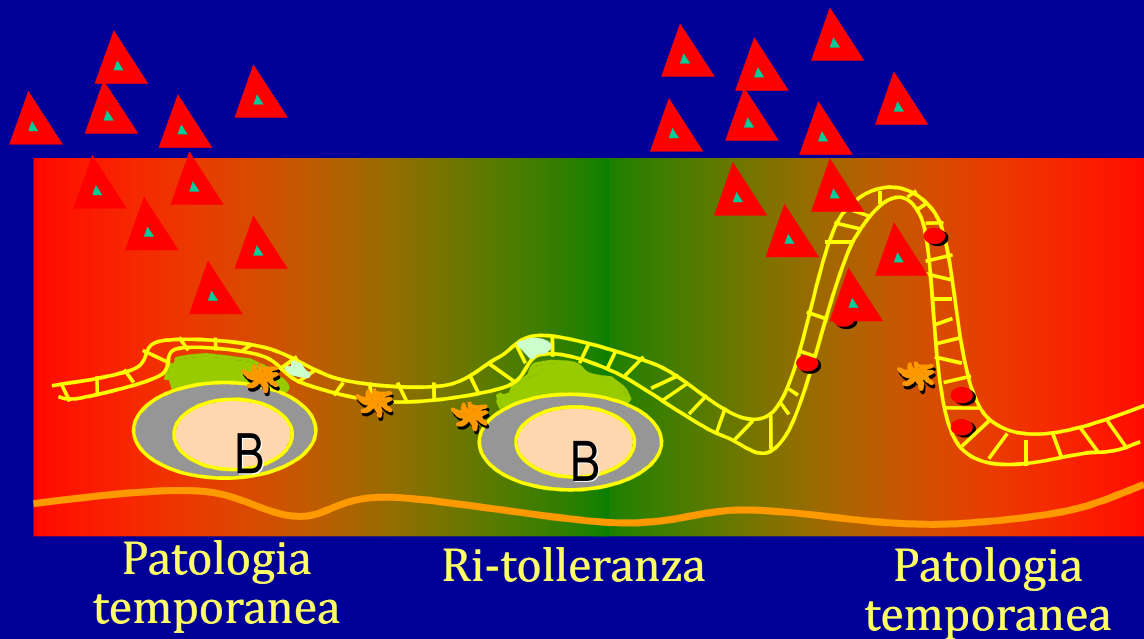


Apoptosi

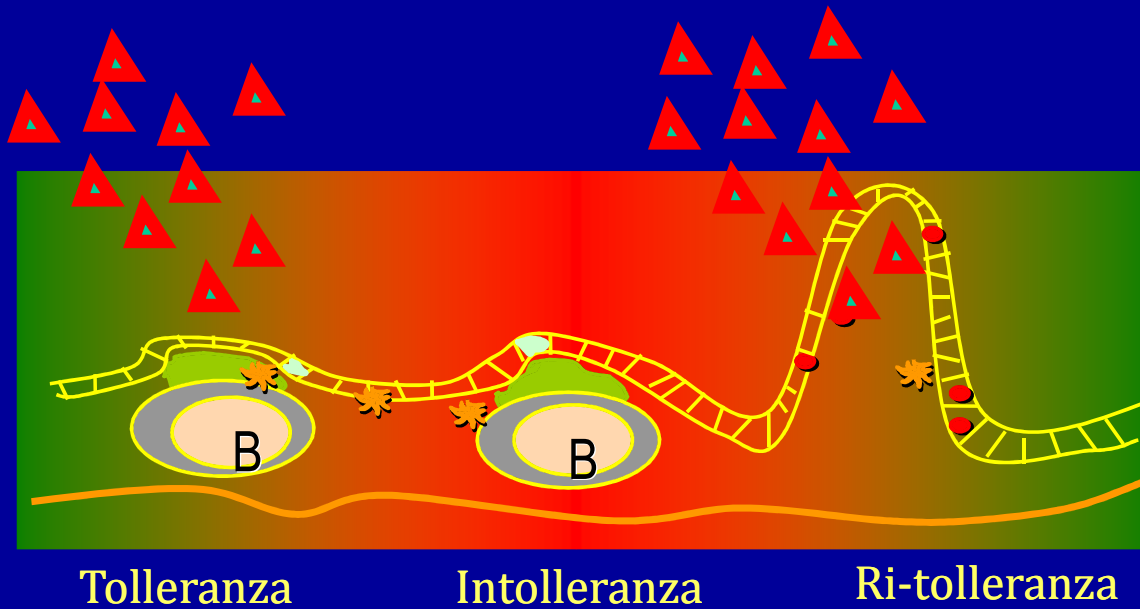
- A seconda della quantità di cibo esse saranno in grado di operare una soppressione attraverso meccanismi vari che vanno dalla immunoregolazione soppressiva alla (possibile) apoptosi.



- A seconda della quantità di cibo esse saranno in grado di operare una soppressione attraverso meccanismi vari che vanno dalla immunoregolazione soppressiva alla (possibile) apoptosi.
- I 2 meccanismi sono da considerarsi sovrapponibili e coesistenti, anche per uno stesso allergene (questo può spiegare una certa variabilità clinica della DO)



- Possiamo immaginare che, anche nel sano, situazioni infiammatorie acute (o anche cronicizzate) possano indurre una sensibilizzazione che può essere temporanea. Il ri-mangiare può rimettere le cose al loro posto
- Questo potrebbe spiegare fenomeni transitori di non tolleranza spesso riferita da pazienti piccoli, ma anche da adulti ...

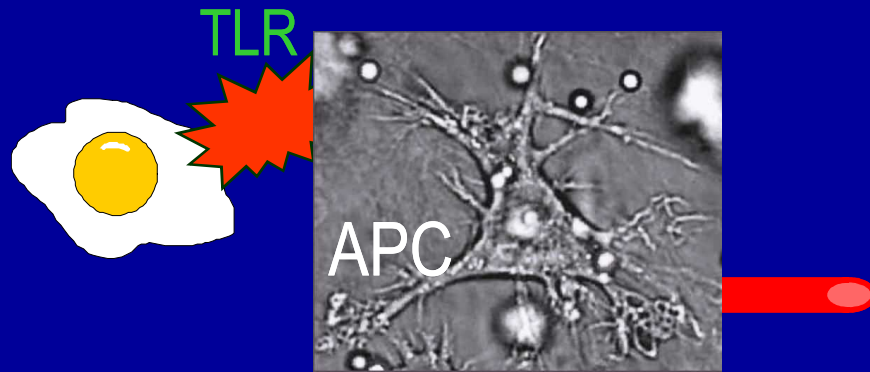


Tolleranza

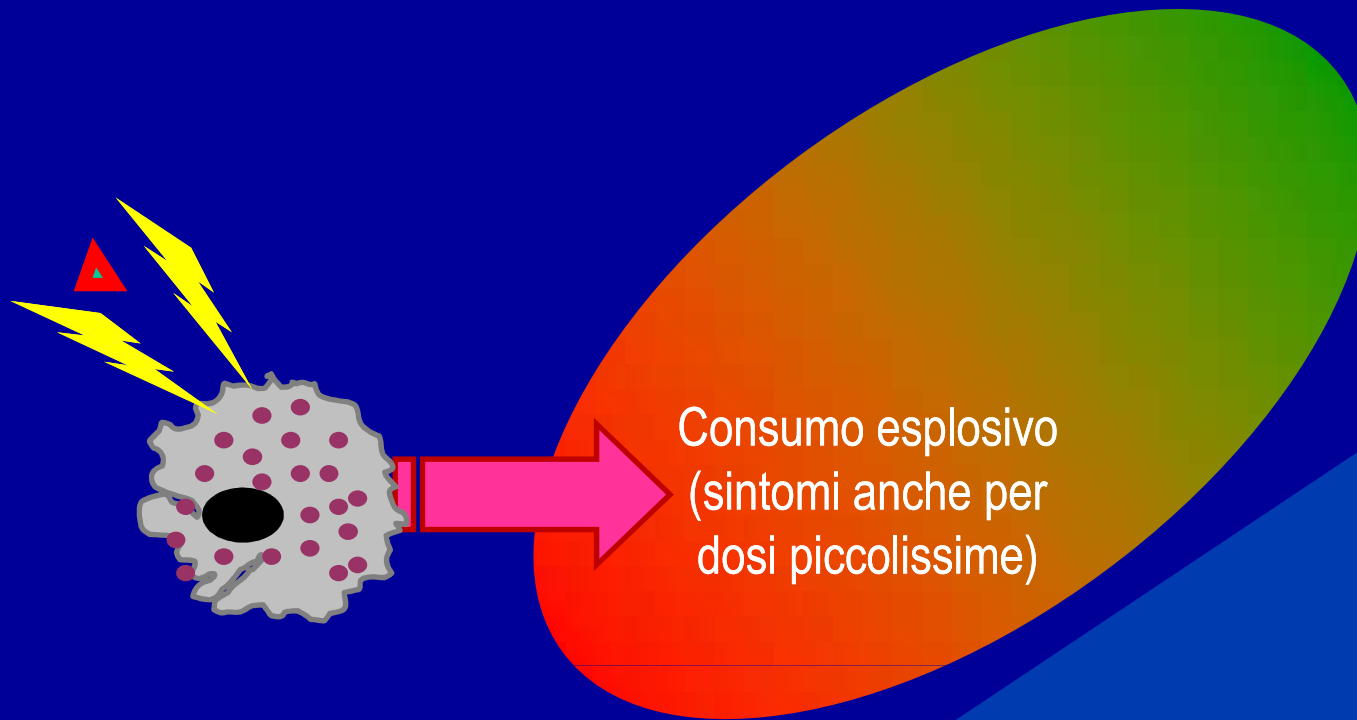
Intolleranza

Ri-tolleranza

- Al contrario, possiamo immaginare che, poiché la tolleranza è un meccanismo continuo e sempre attivo, possa scatenarsi un'intolleranza se durante la desensibilizzazione subentrino situazioni infiammatorie o se venga sospeso l'alimento.
- In questo caso l'organismo si resetta verso la situazione Th2 che il ri-mangiare fa di nuovo indirizzare verso una ri-tolleranza



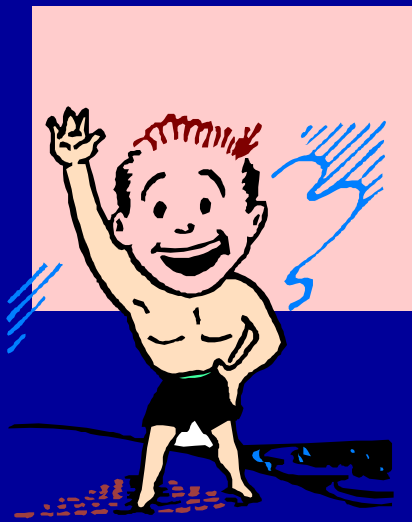
- Ipoteticamente, se il TLR è stimolato (per motivi genetici) proprio dal cibo, non sarà forse mai possibile, in quel soggetto, raggiungere una tolleranza, perchè il cibo sarà sempre presentato male alle cellule competenti con shift costantemente allergenico, anziché tollerogeno.

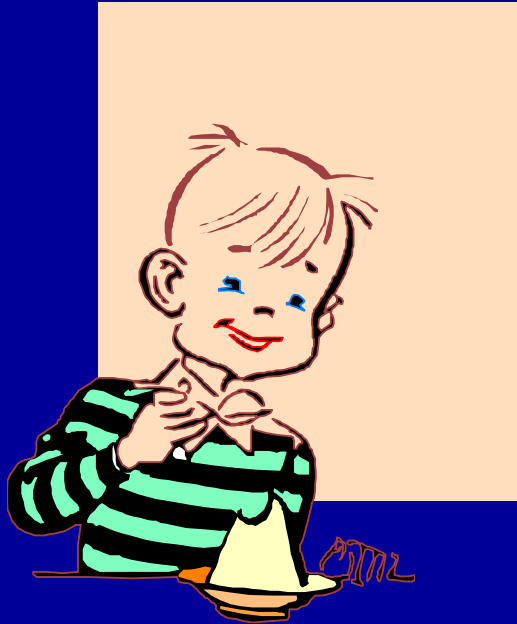


- D'altro canto, in soggetti molto sensibili, non si può procedere sia perché questo induce sintomi, ma soprattutto perché anche piccole dosi creano infiammazione e quindi possibile attivazione del TLRs ...

Conclusioni

1. La tolleranza alimentare inizia dalla condizione fetale, favorita dall'ambiente non infiammatorio e GERM FREE
2. La DO è il tentativo di re-indurre nell'organismo la risposta naturale che è quella della tolleranza attiva
3. La NON-INFIAMMAZIONE (leggi non attivazione dei TLRs o di altro che ancora non conosciamo) è prerequisito fondamentale per (re)indurre la tolleranza
4. Siamo, probabilmente, di fronte ad un equilibrio continuo, giocato giorno per giorno fra tolleranza definitiva (deplezione, apoptosi) e tolleranza regolatoria.
5. L'allergia alimentare (e forse la respiratoria) si possono inquadrare nel capitolo molto più ampio dei deficit della tolleranza che include anche le malattie tumorali, le autoimmuni e le IBD. Un sottogruppo potrebbe essere quello della "patologia" del TLR
6. L'insuccesso della DO spesso dovuto all'impossibilità di procedere (eccesso di sintomi), ma forse anche alla presenza di uno stato infiammatorio che favorisce (o è favorito da)
Rattivazione dei TLR





La DO è, di fatto, una terapia immunologica, ma sono forse da considerare terapie immunologiche continue il mangiare e, probabilmente, anche il respirare ...